

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**ESTUDO DA ATIVIDADE DE FLAVONÓIDES E DE COMPLEXOS DE VANÁDIO  
NA GLICEMIA DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS COM ALOXANA**

**LUIZA HELENA CAZAROLLI**

Florianópolis  
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

ESTUDO DA ATIVIDADE DE FLAVONÓIDES E DE COMPLEXOS DE VANÁDIO  
NA GLICEMIA DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS COM ALOXANA

LUISA HELENA CAZAROLLI

**Trabalho apresentado como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre  
em Farmácia na Universidade Federal  
de Santa Catarina**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. FÁTIMA REGINA MENA BARRETO SILVA

Florianópolis  
2004

Dedico este trabalho a minha família, José, Eliria e Juciana Cazarolli que mesmo longe fisicamente, estiveram sempre presentes com seu carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a oportunidade de realizar mais um sonho.

Aos meus pais José e Eliria Cazarolli e irmã Juciana Cazarolli pelo amor e carinho e por toda a ajuda e compreensão em todos os momentos da minha vida.

A minha orientadora, prof<sup>a</sup> Dra Fátima Regina Mena Barreto Silva, pela confiança em mim depositada, pela ajuda, dedicação e seriedade em todos os momentos.

Ao Rafael Nicolay Pereira, pelo carinho, paciência e apoio em todas as situações.

Às colegas de laboratório, Eliandra de Sousa, Ana Paula Jorge, Cinira Fandaruff, Leila Zanatta, Carine Royer, Poliane Folador, Danuza Menegaz, Julia Frare e Csele Van Sand pelos bons momentos, pelo apoio e ajuda.

Aos Prof. Dr Moacir Geraldo Pizzolatti e Dr Bruno Szpoganics pelos ensinamentos e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório de equilíbrio químico pela ajuda e paciência.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação pelos momentos de convivência e pelos ensinamentos compartilhados.

Aos meus amigos Tiago Bittencourt de Oliveira e Patrik Rodrigues pela agradável convivência e apoio nesse período.

A todos os amigos e colegas não mencionados, mas que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvii</b>
<b>1     <u>INTRODUÇÃO.....</u></b>	<b>1</b>
1.1    Plantas Medicinais.....	1
1.1.1 <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	3
1.1.2 <i>Cyathea phalerata</i> .....	7
1.1.3   Flavonóides.....	9
1.2    Vanádio.....	11
1.2.1   Propriedades Químicas do Vanádio.....	13
1.2.2   Propriedades Biológicas do Vanádio.....	15
1.3    Diabetes Melito.....	24
1.3.1   Insulina.....	25
1.3.2   Regulação do Metabolismo da Glicose.....	28
1.3.3   Terapia Insulínica.....	32
1.3.4   Hipoglicemiantes Orais.....	34
<b>2     <u>JUSTIFICATIVA.....</u></b>	<b>35</b>
<b>3     <u>OBJETIVOS.....</u></b>	<b>37</b>

<b>4</b>	<b><u>MATERIAIS E MÉTODOS.....</u></b>	<b><u>39</u></b>
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1.1	Reagentes.....	39
4.1.2	Soluções.....	40
4.1.3	Equipamentos Utilizados.....	41
4.1.4	Obtenção de Compostos Naturais da Espécie <i>Bauhinia forficata</i> Link.....	42
4.1.4.1	Coleta e Identificação.....	42
4.1.4.2	Preparo do Extrato Bruto e Frações.....	42
4.1.4.3	Isolamento dos Flavonóides das Folhas.....	42
4.1.4.4	Caracterização dos Compostos.....	43
4.1.5	Compostos Majoritários Isolados das Folhas da <i>Bauhinia forficata</i> .....	45
4.1.6	Obtenção de Compostos Naturais da Espécie <i>Cyathea phalerata</i> .....	47
4.1.6.1	Coleta e Identificação.....	47
4.1.6.2	Preparo do Extrato Bruto e Frações.....	47
4.1.6.3	Isolamento dos Flavonóides.....	47
4.1.6.4	Caracterização dos Compostos.....	48
4.1.7	Compostos Majoritários Isolados do Caule Fresco da <i>Cyathea phalerata</i> .....	50
4.1.8	Estudo dos Equilíbrios Químicos do Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) e Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-Ramnopiranosil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo - VO(IV).....	51
4.1.8.1	Ligantes.....	51
4.1.8.2	Reagentes.....	51
4.1.8.3	Solventes.....	52
4.1.8.4	Medidas de Equilíbrio Potenciométrico.....	52
4.1.8.5	Computação.....	54
4.1.9	Animais.....	54
4.1.10	Modelo de Diabetes Experimental.....	55
4.1.11	Coleta do Sangue e Determinação da Glicemia.....	56
4.2	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	57
4.2.1	Tratamentos Utilizando a Via Intraperitoneal.....	58

4.2.1.1	Efeito da Insulina 0,1 e 0,5 UI em Ratos Normais Hiperglicêmicos.....	58
4.2.1.2	Efeito da Insulina 0,5 UI em Ratos Diabéticos Induzidos com Aloxana 50 mg/kg.....	58
4.2.1.3	Efeito do Vanádio(IV) na Glicemia de Animais Diabéticos.....	58
4.2.1.4	Efeito dos Flavonóides Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo e Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo na Glicemia em Ratos Diabéticos.....	59
4.2.2	Tratamentos com Diferentes Compostos Naturais por Gavagem pela Via Oral.....	60
4.2.3	Tratamentos com os Complexos (Flavonóide + Vanádio) pelas Vias Oral e Intraperitoneal.....	61
4.2.3.1	Efeito do Complexo Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 na Glicemia de Ratos Diabéticos.....	61
4.2.3.2	Efeito do Complexo Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo - VO(IV) 1:1 na Glicemia de Ratos Diabéticos....	62
4.3	DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
4.4	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE FÍGADO DE RATOS TRATADOS COM VANÁDIO.....	64
5	<b><u>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u></b>	<b>66</b>

## PARTE I

5.1	Caracterização do Modelo Experimental do Diabetes Melito Tipo I Induzido por Aloxana.....	66
5.2	Efeito Agudo da Administração de Insulina por Via Intraperitoneal na Curva de Tolerância à Glicose.....	67
5.3	Estudo da Relação Estrutura-Atividade de Flavonóides na Glicemia de Ratos Diabéticos.....	71
5.3.1	Provenientes das folhas da <i>Bauhinia forficata</i> .....	71
5.3.2	Provenientes do caule fresco da <i>Cyathea phalerata</i> .....	79

## PARTE II

5.4	Estudos de Equilíbrio Químico do Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-Diramnosídeo-VO(IV) e do Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-Ramnopiranosil $\beta$ -D-Glicopiranosídeo- VO(IV).....	86
5.4.1	Medidas do Equilíbrio Potenciométrico do Sistema Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L- diramnosídeo-VO(IV).....	86
5.4.2	Medidas do Equilíbrio Potenciométrico do Sistema Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV).....	90
5.5	Estudo da Atividade Hipoglicemiante dos Complexos Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-Diramnosídeo-VO(IV) (2:1) e Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-Ramnopiranosil $\beta$ -D-Glicopiranosídeo- VO(IV) (1:1).....	93
5.5.1	Efeito Agudo da Administração por Via Oral e Intraperitoneal do Vanádio (IV) em Ratos Diabéticos.....	93
5.5.2	Efeito dos Complexos Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 e Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) 1:1 por Via Oral.....	98
5.5.3	Efeito dos Complexos Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 e Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) 1:1 por Via Intraperitoneal.....	102
5.5.4	Efeito Comparativo dos Complexos Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) da <i>B. forficata</i> , do Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) da <i>C. phalerata</i> com o Vanádio e a Insulina por Via Intraperitoneal na Glicemia de Ratos Diabéticos.....	108
6	<b><u>CONCLUSÕES.....</u></b>	<b>112</b>
7	<b><u>PERSPECTIVAS.....</u></b>	<b>115</b>
8	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b>116</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécie vegetal <i>Bauhinia forficata</i> .....	4
Figura 2 - Espécie vegetal <i>Cyathea phalerata</i> .....	8
Figura 3 - Núcleo fundamental dos flavonóides.....	10
Figura 4 – Estruturas químicas dos compostos de vanádio.....	14
Figura 5 - Geometrias de coordenação comuns dos compostos de vanádio (IV) e (V).....	15
Figura 6 – Secreção bifásica da insulina estimulada por glicose.....	26
Figura 7 - Ilustração esquemática do modo de ação da insulina na regulação da captação de glicose em tecidos dependentes de insulina.....	28
Figura 8 - Metabolismo da glicose no estado bem alimentado.....	32
Figura 9 - Estrutura química do composto canferol.....	45
Figura 10 - Estrutura química dos compostos canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L- diramnosídeo e quercetina 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo.....	45
Figura 11 - Estrutura química dos compostos canferol 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil- (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -L-ramnopiranosil-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e quercetina 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -L-ramnopiranosil-7-O- $\alpha$ -L- ramnopiranosídeo.....	46
Figura 12 - Estrutura química do composto canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo.....	50
Figura 13 - Estrutura química do composto ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil caféico .....	50
Figura 14 - Sistema utilizado na titulação potenciométrica.....	53
Figura 15 - Indução do diabetes através da injeção intravenosa de aloxana.....	56
Figura 16 –Análise histológica de fígado controle (A) e fígado proveniente de animais tratados com vanadato (B).....	65
Figura 17 - Efeito da administração de insulina 0,1 UI e 0,5 UI via intraperitoneal na curva de tolerância à glicose (4 g/kg) em ratos.....	69

Figura 18 - Efeito da administração de insulina 0,5 UI via intraperitoneal na glicemia em animais diabéticos.....	70
Figura 19 - Efeito agudo da administração do canferol (via oral) isolado das folhas da <i>B. forficata</i> em ratos diabéticos.....	72
Figura 20 - Efeito agudo da quercetina via oral em ratos diabéticos.....	74
Figura 21 – Efeito agudo do canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo isolado das folhas da <i>B. forficata</i> em ratos diabéticos. (A) Intraperitoneal; (B) Via oral.....	77
Figura 22 – Curva de dose-resposta do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo (via oral) isolado do caule fresco da <i>C. phalerata</i> em ratos diabéticos.....	80
Figura 23 - Efeito agudo do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo (via intraperitoneal) isolado do caule fresco de <i>Cyathea phalerata</i> em ratos diabéticos.....	82
Figura 24 - Curvas dos equilíbrios potenciométricos para o sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) a $25,00 \pm 0,05$ °C e força iônica $\mu = 0,100$ mol/L (KCl).....	86
Figura 25 - Curvas de distribuição de espécies do sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) em função de $-\log[H^+]$ para uma solução contendo 0,05490 mmol canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e 0,02610 mmol de VO(IV) a $25,00 \pm 0,05$ °C e força iônica $\mu = 0,100$ mol/L (KCl).....	89
Figura 26 - Estrutura proposta para interação do sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) (2:1).....	89
Figura 27 - Curvas do equilíbrio potenciométrico para o sistema canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) a $25,00 \pm 0,05$ °C e força iônica $\mu = 0,100$ mol/L (KCl).....	90
Figura 28 - Curvas de distribuição de espécies do sistema canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) em função de $-\log[H^+]$ para uma solução contendo 0,0503 mmol canferol 3-O-( $\alpha$ )-	

L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo e 0,0503 mmol de VO(IV) a $25,00 \pm 0,05$ °C e força iônica $\mu = 0,100$ mol/L (KCl).....	92
Figura 29 - Estrutura proposta para interação do sistema canferol 3-O- ( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo:VO(IV) (1:1).....	93
Figura 30 - Efeito agudo do vanádio (IV) na dose de 0,0607 mol/L (ou 0,0146 mmol), via oral, em ratos diabéticos.....	95
Figura 31 - Efeito agudo do vanádio (IV) 0,0607 mol/L (ou 0,0146 mmol), via intraperitoneal, em ratos diabéticos.....	97
Figura 32 - Efeito agudo do complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 administrado por via oral nas doses de 0,0294 mmol e do complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D- glicopiranosídeo-VO(IV) 1:1 0,0286 mmol (100 mg/kg) em ratos diabéticos.....	99
Figura 33 -. Efeito agudo do complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 administrado por via intraperitoneal na dose de 100 mg/kg (0,0294 mmol) e da solução de vanádio (IV) (0,0146 mmol) em ratos diabéticos.....	103
Figura 34. Efeito agudo do complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo – vanádio (IV)1:1 na dose de 100 mg/kg (0,0286 mmol) administrado por via intraperitoneal e da solução de vanádio (IV) (0,0146 mmol) em ratos diabéticos.....	106
Figura 35. Efeito comparativo dos complexos canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L- diramnosídeo-VO(IV) e canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) com o vanádio (IV) 0,0146 mmol e insulina exógena 0,5 UI por via intraperitoneal em ratos diabéticos.....	109
Fluxograma 1 - Representação esquemática do fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de <i>Bauhinia forficata</i> .....	44
Fluxograma 2 - Representação esquemática do fracionamento do extrato bruto etanólico do caule fresco de <i>Cyathea phalerata</i> .....	49
Fluxograma 3 - Representação esquemática dos ensaios para avaliação do	

efeito da insulina nas doses de 0,1 e 0,5 UI em animais normais hiperglicêmicos e diabéticos.....	59
Fluxograma 4 - Representação esquemática para avaliação do efeito dos flavonóides canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( <i>C. phalerata</i> ) e canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo ( <i>B. forficata</i> ) na dose de 100 mg/kg e do vanádio (IV) administrados por via intraperitoneal.....	60
Fluxograma 5 - Representação esquemática dos tratamentos com diferentes compostos naturais administrados por via oral.....	61
Fluxograma 6 - Representação esquemática dos tratamentos com os complexos (flavonóide + vanádio) pelas vias oral e intraperitoneal.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Complexos de vanádio com diferentes modos de coordenação que apresentam atividade hipoglicêmica em ratos diabéticos. ....	23
Tabela 2 - Efeito da aloxana na dose de 50 mg/kg no peso corporal e na glicemia após o terceiro dia de indução.....	67
Tabela 3 - Constantes de protonação do canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e suas constantes de ligação com o íon metálico VO(IV) a 25,00 $\pm$ 0,05 °C e $\mu$ = 0,100 mol/L (KCl). ....	88
Tabela 4 - Constantes de protonação do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo e constantes de ligação com íon metálico VO(IV) a 25,00 $\pm$ 0,05 °C e $\mu$ = 0,100 mol/L (KCl).....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	Microgramas
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
PYD	complexo de bis(pirrolidina-N-ditiocarbonato)oxovanádio(IV)
$[\text{}^{14}\text{C}]\text{DG}$	2- $[\text{}^{14}\text{C}$ (U)]-Deoxi-D-Glicose
$[\text{VO}(\text{malto})_2]$	complexo de bis(maltolato)oxovanádio (IV)
$[\text{VO}(\text{metf})_2]$	complexo de bis(metformina)oxovanádio (IV)
AcOEt	Acetato de etila
ADN	Ácido desoxiribonucléico
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
<i>B. forficata</i>	<i>Bauhinia forficata</i>
BMOV	complexo de bis(maltolato)oxovanádio (IV)
<i>C. phalerata</i>	<i>Cyathea phalerata</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
CEUA	Comitê de ética do uso de animais
CitPTK	Proteína tirosina quinase citosólica
$\text{DL}_{50}$	Dose letal 50%
DM	Diabetes Melito
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
G-6P	Glicose 6-fosfato
GLUT	Transportador de glicose
GOD	Glicose oxidase
h	Horas

$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
$\text{H}_2\text{VO}_4^-$	Metavanadato
$\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$	Hidrogênio-Potássio ATPase
Hiper	Hiperglicêmico
IDDM	Diabetes melito dependente de insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
IRS-2	Substrato 2 do receptor de insulina
ins	Insulina
KDa	Quilodaltons
K-diRh	Canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo
K-diRh-VO	Complexo canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo – vanádio(IV)
kg	Quilograma
KHP	Biftalato ácido de potássio
$K_m$	Constante cinética de Michaelis Menten
K-3RhG	Canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo
K-3RhG-VO	Complexo canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo – vanádio (IV)
m	Metros
mg	Miligrama
MembPTK	Proteína tirosina quinase de membrana
mL	Mililitro
mmol	Milimol
mol/L	Mol por litro
n	Número de amostras
$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$	Sódio-Potássio ATPase
$\text{NAD}^+$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
NIDDM	Diabetes melito não dependente de insulina
nM	nanomolar
NPH	Insulina com protamina neutra de Hagedorn
°C	Graus Celsius

P.A.	Para análise
P-I-3-K	Fosfatidilinositol 3 quinase
pKw	Produto iônico da água
POD	Peroxidase
PTK	Proteína tirosina quinase
PTPases	Fosfoproteínas tirosina fosfatases
RMN $^{13}\text{C}$	Ressonância magnética nuclear de carbono – 13
RMN $^1\text{H}$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
STZ	Estreptozotocina
UI	Unidade internacional
UV	Ultravioleta
V(IV)	Vanádio de estado de oxidação +4
V(V)	Vanádio de estado de oxidação +5
v/v	Relação volume por volume
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
VO (IV)	Vanádio (IV)
VO(acac) <sub>2</sub>	complexo de bis(acetilacetato)oxovanádio (IV)
VO(cysm) <sub>2</sub>	complexo de bis(cisteína-metil-éster)oxovanádio (IV)
VO(Et-acac) <sub>2</sub> .	complexo de bis (3-etil-acetilacetato)oxovanádio (IV)
VO(ka) <sub>2</sub>	complexo de bis (kojato)oxovanádio (IV)
VO(ox) <sub>2</sub>	complexo de bis(oxalato)oxovanádio(IV).
VO(sal) <sub>2</sub>	complexo de bis(salicilaldeído)oxovanádio(IV)
VO(tar) <sub>2</sub>	complexo de bis ((+)tartarato) [VO(tar) <sub>2</sub> ]oxovanádio (IV)
VO <sup>2+</sup>	Vanadil
VO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Metavanadato
VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Ortovanadato
VOSO <sub>4</sub>	Sulfato de vanádio



## RESUMO

Muitas espécies de plantas são conhecidas na medicina popular pelas propriedades hipoglicemiantes e pelo uso no tratamento do diabetes. Entre as utilizadas como hipoglicemiantes estão a *Bauhinia forficata* e a *Cyathea phalerata*, denominadas popularmente como “Pata de vaca” e “Xaxim”, respectivamente. Entretanto, pouco se sabe a respeito da ação medicinal e composição micromolecular destas plantas. Recentemente foram isolados compostos presentes nas frações AcOEt e *n*-butanol das folhas da *Bauhinia forficata*, entre estes o majoritário, canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo que apresentou efeito hipoglicemiante. Do caule da *Cyathea phalerata* também foram isolados alguns flavonóides sendo o canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo o composto predominante. O presente trabalho teve como objetivos estudar os compostos isolados (glicosilados ou não) da *Bauhinia forficata* bem como do flavonóide isolado da *Cyathea phalerata* na atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos e estudar a ação dos complexos dos flavonóides canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo com vanádio (IV) na glicemia de animais diabéticos, bem como, comparar a biopotência destes compostos (por diferentes vias de administração) com a insulina e o vanádio. Foram utilizados ratos Wistar machos entre 50-55 dias de idade. O diabetes foi induzido com 50 mg/kg de aloxana. Nos experimentos onde foram estudados os níveis glicêmicos, as dosagens foram realizadas nos tempos de 0, 1, 2, 3, 6, e 24 h após a administração dos compostos via oral ou intraperitoneal. A insulina 0,5 UI administrada por via intraperitoneal caracterizou um perfil de redução da glicemia típico em ratos normais e diabéticos. O composto canferol não apresentou ação hipoglicêmica significativa em nenhuma das doses utilizadas. A quercetina apresentou ligeiro efeito hipoglicemiante na dose de 100 mg/kg. O canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo isolado da *Cyathea phalerata* apresentou atividade hipoglicemiante nas doses de 50 e 100 mg/kg em todos os tempos estudados, tanto por via oral quanto intraperitoneal. O canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo, isolado das folhas da *Bauhinia forficata* reduziu significativamente a glicemia em ratos diabéticos quando administrado por via intraperitoneal num período de 0-24 h. Os complexos de vanádio (IV) foram estudados através de tratamentos por via oral e intraperitoneal em um período de 24 h em ratos diabéticos. O complexo canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO (IV) 2:1 apresentou atividade hipoglicêmica significativa apenas quando administrado pela via intraperitoneal em todos os tempos estudados. Este complexo foi tão efetivo quanto o vanádio (IV) livre e apresentou cerca de 26% de potência comparado à insulina. Já o complexo canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO (IV) 1:1 reduziu significativamente a glicemia quando administrado pela via intraperitoneal até as 24 h. Este complexo apresentou 83% de biopotência comparado à insulina e foi mais potente que o vanádio livre, que o composto pela mesma via e mais potente que o complexo canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 neste mesmo protocolo.

## ABSTRACT

Recent years have witnessed great progress involving chemical and pharmacological studies of medicinal plants, in the search for new compounds with therapeutic properties. Many species are known in popular medicine of various cultures for their hypoglycemic properties and for their increasing use in the treatment of diabetes. Among the plants used in popular medicine are *Bauhinia forficata* and *Cyathea phalerata*, popularly known as “Pata de vaca” and “Xaxim”, respectively. However, little is known with respect to the medicinal action and the micromolecular composition of these plants. Several compounds were recently isolated from the ethyl acetate and *n*-butanolic fractions of the leaves of *B. forficata*, among which the principal constituent, kaempferol 3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside, exhibited a hypoglycemic effect. Some flavonoids were isolated from the stem of *Cyathea phalerata*, with kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopyranosil  $\beta$ -D-glycopyranoside being the major compound. The present study sought to evaluate the hypoglycemic activities of *Bauhinia forficata* compounds and of the *Cyathea phalerata* flavonoid in diabetic rats as well as to study the effect of the flavonoid complexes with vanadium (IV), kaempferol 3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside-VO(IV) and kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopyranosil  $\beta$ -D-glycopyranoside-VO(IV) on glycemia in diabetic animals. Male Wistar rats were used between 50 and 55 days of age. Diabetes was induced with 50 mg/kg of alloxan. In the experiments in which glycemia was assessed, the dosages were given 0, 1, 2, 3, 6 and 24 hours after the administration of compounds by gavage or intraperitoneal (i.p.) route. Kaempferol did not present any significant hypoglycemic action. Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopyranosil  $\beta$ -D-glycopyranoside exhibited hypoglycemic activity at all times examined and at the 50 and 100 mg/kg doses administered by gavage and i.p. route. Kaempferol 3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside significantly reduced the glycemia in diabetic rats submitted to an acute treatment (0-24 h) by i.p. route. Vanadium (IV) complexes were evaluated against glucose levels in alloxan-induced diabetic rats by i.p. route and by gavage. Kaempferol 3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside-VO(IV) 2:1 complex had a hypoglycemic effect in alloxan-diabetic rats after i.p. administration and it was as effective as the VO<sup>2+</sup> alone. Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopyranosil  $\beta$ -D-glycopyranoside-VO(IV) 1:1 complex significantly reduced glycemia in diabetic rats after i.p. administration in an acute treatment (0-24 h). This complex was 2.5 times more effective than vanadium (IV) alone, 2 times better than the compound alone and 3 times more active than kaempferol 3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside-VO(IV) 2:1 complex in the same experimental model. From these results we can conclude that kaempferol 3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside is the main compound responsible for the hypoglycemic activity of *B. forficata* and its vanadium (IV) complex is effective in reducing glycemia in alloxan-diabetic rats. Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopyranosil  $\beta$ -D-glycopyranoside isolated from *C. phalerata* exhibits activity against the glycemic levels in diabetic rats and the i.p. administration of the complex kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopyranosil  $\beta$ -D-glycopyranoside-VO(IV) 1:1 resulted in a significant blood glucose lowering over the time studied.

Key Words: diabetes; flavonoids; vanadium complexes; glycemia; medicinal plants.

# INTRODUÇÃO

## 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana e por muito tempo produtos de origem vegetal, animal e mineral foram as principais bases da terapêutica. Cerca de 25% dos fármacos prescritos mundialmente vêm de plantas, 80% das prescrições em países em desenvolvimento são produtos naturais, 50% são sintéticos cujos protótipos têm origem nos princípios isolados de plantas medicinais e dos 252 fármacos considerados como essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são exclusivamente de origem vegetal (YUE-ZHONG, 1998; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; RATES, 2001;).

O Brasil é o país com a maior diversidade vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Deste número, apenas cerca de 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e aproximadamente 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES et al., 2001).

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas, sendo que, a cada momento são relatadas na literatura novas moléculas, algumas com ação farmacológica relevante que podem, futuramente, ser utilizadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; YUE-ZHONG, 1998; RATES, 2001).

É importante mencionar que as plantas, além do uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica como por exemplo: atropina (*Atropa belladonna* L.), morfina, codeína (*Papaver somniferum* L.), quinina (*Cinchona* spp.), entre outras (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; SIMÕES et al., 2001). Cabe ressaltar ainda que há um interesse crescente nas plantas medicinais devido a aspectos como: efetividade de ação, mínimos efeitos colaterais em estudos clínicos e custo relativamente baixo. Essas plantas são amplamente prescritas e utilizadas pela população apesar dos compostos ativos nem sempre serem conhecidos.

No Brasil, apenas 20% da população é responsável por 63% do consumo de medicamentos sintéticos disponíveis, sendo que o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a principal ou a única fonte de recursos terapêuticos (SIMÕES et al., 2001).

Muitas espécies de plantas são conhecidas na medicina popular de diferentes culturas pelas propriedades hipoglicemiantes e pelo uso crescente no tratamento do diabetes (ABDEL-BARRY et al., 1997). Apoiado no conhecimento e uso popular, a pesquisa e a comprovação dos efeitos e dos constituintes dessas plantas torna esta área cientificamente atrativa. Este crescimento deve-se ao fato de que as substâncias encontradas nestas plantas possam servir como agentes hipoglicemiantes que mimetizam o efeito da insulina. Dessa forma, estas substâncias poderiam substituir as dolorosas injeções de insulina, alívio na vida dos diabéticos do tipo I, minimizariam os efeitos colaterais dos agentes hipoglicemiantes orais no caso dos diabéticos do tipo II e também diminuiriam os elevados custos do tratamento para pessoas de baixa renda (DE SOUSA, 2003).

A Organização Mundial da Saúde incentiva a utilização de plantas medicinais para o tratamento de várias enfermidades, inclusive o diabetes, doença que atinge cerca de 151 milhões de pessoas no mundo, especialmente em países

onde o acesso aos tratamentos convencionais não são adequados (WHO, 1980; ABDEL-BARRY et al., 1997).

Segundo registro feito por Marles e Farnsworth (1995) existem cerca de 1200 espécies de plantas, pertencentes a 190 famílias que apresentam atividade hipoglicemiante. Na pesquisa por novos compostos, e na exploração de fontes naturais, o efeito de plantas popularmente conhecidas como hipoglicemiantes é amplamente estudado. Entre as mais difundidas estão: *Trigonella foenum-graecum*, *Zygophyllum gaetulum*, *Terminalia pallida* Brandis, *Terminalia chebula*, *Punica granatum* Linn., *Picrorrhiza kurroa*, *Psacalium decompositum*, *Bauhinia forficata* (ABDEL-BARRY et al., 1997; JOY; KUTTAN, 1999; ALARCÓN-AGUILAR et al., 2000; JAOUHARI et al., 2000; JAFRI et al., 2000; SILVA et al., 2002; RAO et al., 2003).

A pesquisa destas e de outras espécies com potencial hipoglicemiante conhecidos na medicina popular, almeja a comprovação dos efeitos, a caracterização dos constituintes fitoquímicos e o esclarecimento dos mecanismos de ação destes compostos. Como perspectiva desses estudos, está a alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de compostos naturais com comprovada atividade hipoglicêmica e até mesmo a utilização dos compostos nas mais variadas formulações (complexados ou não) como adjuvantes ao tratamento do diabetes.

#### **1.1.1 *Bauhinia forficata* Link**

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Caesalpiniaceae (formalmente Leguminosae), as quais são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo aproximadamente 300 espécies. Muitas dessas plantas são utilizadas na medicina popular em várias regiões do mundo,

incluindo a África, Ásia, América Central e do Sul (DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

No Brasil, as plantas do gênero *Bauhinia* são conhecidas como “Pata de vaca” ou “Unha de boi”. As folhas, caules e raízes das espécies de *Bauhinia*, são amplamente utilizadas na forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades, principalmente infecções, processos dolorosos e diabetes (JULIANI, 1929; 1931; 1941; COSTA, 1975; DA SILVA et al., 2000; DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

A *Bauhinia forficata* Link (*B. forficata*) apresenta-se como uma árvore de porte médio, que atinge 5 a 9 m de altura. É encontrada do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Sul, possui folhas bipartidas (uncinadas) com formato semelhante a uma pata de vaca, característica que é distintiva do gênero, flores brancas e frutos do tipo vagem linear (figura 1). A infusão das folhas é utilizada como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à elefantíase e na redução da glicosúria (MARTINS et al., 1998; PIZZOLATTI et al., 2003).

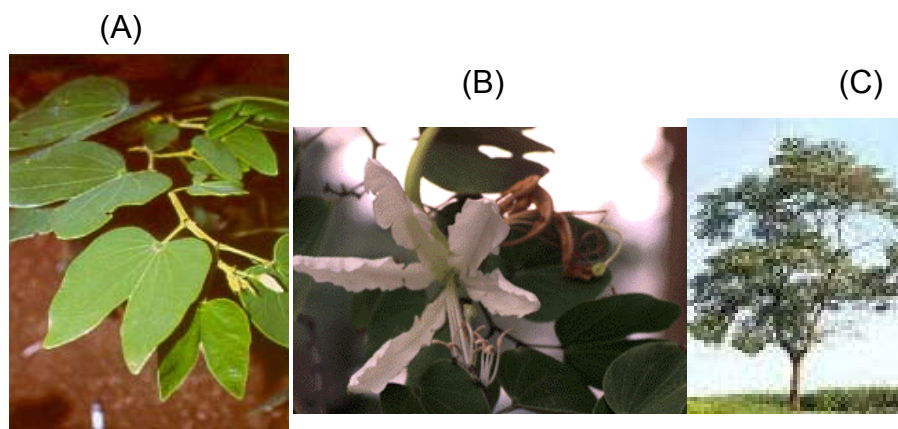


Figura 1. Espécie vegetal *Bauhinia forficata*. A) Folhas bipartidas; B) Flores brancas; C) Árvore.

Os primeiros relatos sobre a ação hipoglicemiante da *B. forficata* em pacientes diabéticos foram demonstrados por Carmela Juliani em 1929 e 1931 (JULIANI, 1929, 1931). Uma década mais tarde, Juliani voltou a demonstrar os efeitos hipoglicêmicos da *B. forficata* em cães e coelhos submetidos à

hiperglicemia adrenalítica e pancreactomizados (JULIANI, 1941). Outros estudos foram e estão sendo desenvolvidos, como o de Caricati-Neto e colaboradores (1985) que observaram mudanças significativas na glicemia de ratos diabéticos após administração intraperitoneal da fração aquosa da planta.

Por outro lado, Russo e colaboradores (1990) demonstraram que a infusão preparada com as folhas da *B. forficata* e o tratamento tanto agudo quanto crônico (56 dias) não apresentaram efeito hipoglicemiante em pacientes com glicemia normal e em pacientes com diabetes tipo II (não-insulino dependente).

Ainda, contrastando com o efeito antidiabético da *B. forficata* relatado na literatura, Damasceno e colaboradores (2000) verificaram que o extrato alcoólico de folhas desta planta não reduz a concentração de glicose em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Mais recentemente, Pepato e colaboradores (2002) demonstraram uma redução significativa na glicemia e na glicose urinária de animais diabéticos tratados por um período crônico via oral com o chá das folhas da *B. forficata*. Ainda em 2002, Silva e colaboradores observaram um efeito significativo de redução da glicemia em ratos normoglicêmicos e diabéticos após tratamento agudo via oral com o extrato alcoólico (fração *n*-butanol) das folhas de *B. forficata*. Em 2004, Lino e colaboradores mostraram que após a administração dos extratos aquoso, etanólico e hexânico da *B. forficata* por 7 dias em animais diabéticos, os mesmos apresentaram reduções significativas nos níveis de glicose plasmática, triglicerídeos, colesterol total e HDL colesterol.

Os dados existentes na literatura permitem observar que existem controvérsias quanto aos resultados obtidos, porém estes podem ser devidos a vários aspectos tais como: tipos de solo, clima, condições em que foi feito o cultivo e o armazenamento da planta e variações sazonais. Ainda devem ser levadas em consideração as diferentes formas, frações e vias de administração utilizadas nos ensaios (SILVA et al., 2002; DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; DE SOUSA et al., 2004).

Várias espécies do gênero *Bauhinia* foram e estão sendo estudadas fitoquímica e farmacologicamente, assim, diferentes classes de compostos orgânicos de interesse medicinal existentes nessas espécies foram relatados, incluindo glicosídeos esteróides, triterpenos, lactonas e flavonóides (DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; PIZZOLATTI et al., 2003).

Os trabalhos mais relevantes sobre a composição fitoquímica da *B. forficata* demonstram que ela é caracterizada pelo acúmulo de flavonóides livres e glicosilados nas folhas e flores sendo que são relatados na literatura a presença de  $\beta$ -sitosterol e canferol-3,7-diramnosídeo, sendo este último somente encontrado nas folhas da planta (DA SILVA et al, 2000). Pizzolatti e colaboradores (2003) realizaram o isolamento e a identificação de canferol e mais cinco flavonóides glicosilados contendo os flavonóis canferol e quercetina como agliconas. Porém, apesar de muitos compostos serem conhecidos, pouco se conhece sobre as atividades biológicas e o comportamento farmacológico da maioria das substâncias isoladas do gênero *Bauhinia*. Com o intuito de estudar os constituintes da *B. forficata* individualmente, De Sousa e colaboradores (2004) avaliaram a atividade aguda do composto majoritário da fração *n*-butanol das folhas da *B. forficata*, canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (canferitrim) após administração oral em animais normoglicêmicos e diabéticos observando significativo efeito hipoglicêmico e atividade antioxidante dos mesmos.

Além disso, Jorge e colaboradores em 2004 demonstraram a ação do canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (canferitrim) incorporado em membranas lipossômicas na glicemia de animais diabéticos, tendo sido efetivo em reduzir significativamente os níveis glicêmicos em concentrações significativamente menores àsquelas observadas com o flavonóide livre. O canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (canferitrim) também foi estudado na captação de 2-[ $^{14}$ C (U)]-deoxi-D-glicose em músculo sóleo de ratos demonstrando efeitos estimulatórios significativos e percentualmente tão eficientes quanto aos observados com a insulina (0,5 e 1,0 UI). Ainda neste trabalho, foi demonstrado que o composto não



alterou a síntese protéica no músculo nem alterou os níveis de glicose urinária num período agudo de tratamento.

### 1.1.2 *Cyathea phalerata*

Apoiado em informações disponíveis na literatura, os flavonóides das samambaias são primariamente restritos a quatro grupos principais: flavonóis, C-glicosilflavonas, flavonas e flavanonas. Outros tipos de flavonóides também são conhecidos para as samambaias, porém de forma mais esporádica como antocianinas, chalconas, xantonas, flavanonóis e as biflavonas (WALLACE, 1989). Com mais de 12000 espécies, as samambaias arborescentes encontradas em algumas famílias tropicais como a *Cyatheaceae* constituem uma importante divisão de representantes do reino vegetal (BRINGMANN et al., 1999). O gênero *Cyathea* consiste de samambaias arborescentes que variam de 4 a 8 m de altura e encontram-se amplamente distribuídas pelas áreas tropicais e subtropicais do planeta. Muitas espécies são utilizadas em algumas regiões para o tratamento de doenças venéreas e como anti-helmíntico (ARAI et al., 1994; ARAI et al., 1995; BRINGMANN et al., 1999).

A primeira investigação sobre os constituintes flavonóides no gênero *Cyathea* (*Cyatheaceae*) foi realizada por Harada et al. (1955,1958) que analisou as folhas de *C. fauriei* e *C. hancockii* durante um levantamento sobre a distribuição de flavonas, flavonóis e flavanonas nas samambaias japonesas. De acordo com eles, as espécies continham canferol, cirtominetina e farrerol e uma flavona caracterizada mais tarde como vitexina (HIRAOKA; HASEGAWA, 1975). Concordando com a distribuição dos flavonóides glicosídeos neste gênero, Soeder e Bass (1972) mostraram a ocorrência de flavonas C-glicosídeos (vitexina e isovitexina) nas folhas de três espécies do gênero *Cyathea* da América Latina (HIRAOKA; HASEGAWA, 1975).

Espécies representantes da família Cyatheaceae, acumulam flavonóis O-glicosídeos, predominantemente 3-O-glicosídeos do canferol e quercetina e C-glicosilflavonas e flavanonas (HIRAOKA; HASEGAWA, 1975; HIRAOKA; MAEDA, 1979; WALLACE, 1989). Além desses compostos são características a presença de constituintes triterpenóides e esteróides em determinadas espécies do gênero *Cyathea* (ARAI et al., 1994; ARAI et al., 1995; BRINGMANN et al., 1999). Porém a fitoquímica do gênero *Cyathea* é pouco conhecida, apresentando até o momento escassa literatura a respeito. Os poucos estudos realizados mostram que o gênero é caracterizado fitoquimicamente pelo acúmulo de triterpenos hopanóides e fERNANOS e compostos flavonoídicos glicosilados (CUNHA et al., 2003).

Cunha et al. (2003) realizaram o estudo fitoquímico de *Cyathea phalerata* (*C. phalerata*) (figura 2), resultando no isolamento e caracterização estrutural de dois flavonóides glicosídeos contendo o canferol e o ácido caféico como agliconas: ácido-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosilcaféico e canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (K-3RhG). Este último composto, o metabólito majoritário de *C. phalerata*, ocupa uma posição de destaque podendo ser utilizado como marcador para o controle de qualidade de preparações fitoterápicas desta espécie vegetal.



Figura 2. Espécie vegetal *Cyathea phalerata*

Ainda, *C. phalerata* conhecida popularmente como xaxim, é utilizada na medicina popular regional para o tratamento de afecções renais, amarelão, reumatismo e gripes, porém sem comprovação científica (CUNHA et al., 2003).

Cabe ressaltar que a partir dos resultados obtidos com a espécie *B. forficata* em relação ao potencial hipoglicemiante e sabendo-se que esta caracteriza-se pelo acúmulo de flavonóides do tipo canferol a presença do constituinte canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (muito semelhante ao flavonóide da *B. forficata* que estamos estudando) no caule fresco da *C. phalerata* estimula estudos quanto a atividade e mecanismos de ação (JULIANI, 1929, 1931, 1941; DA SILVA et al, 2000; PEPATO et al., 2002; SILVA et al., 2002; PIZZOLATTI et al., 2003; LINO et al., 2004; DE SOUSA et al., 2004).

### 1.1.3 Flavonóides

O estudo do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns compostos tais como: flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, são objetos de incessantes estudos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; ONG; KHOO, 2000; SILVA et al., 2002; PIZZOLATTI et al., 2003; VESSAL et al., 2003).

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis de ocorrência natural freqüentemente encontrados em várias plantas, frutas e vegetais. A maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono no núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas ( $C_6 - C_3 - C_6$ ). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B (figura 3). Os flavonóides apresentam-se

freqüentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (heterosídeo) (PIETTA, 2000; SIMÕES et al., 2001).

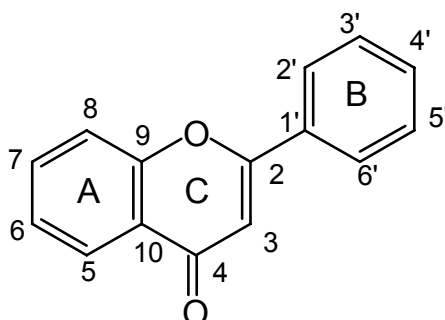


Figura 3. Núcleo fundamental dos flavonóides.

São conhecidos mais de 4200 flavonóides, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. São divididos em várias classes de acordo com o grau de oxidação do oxigênio heterocíclico e com o modelo de substituição no anel C, como exemplo: flavonóis, isoflavonas, catequinas, flavanonas, flavonas, C-heterosídeos, antocianos, chalconas, auronas entre outras (PIETTA, 2000; SIMÕES et al., 2001; TAPIERO et al., 2002). Os flavonóides consumidos a partir da dieta são absorvidos através do estômago e intestino. São metabolizados principalmente no fígado, sendo a mucosa intestinal, túbulos renais, pulmão, pele e placenta sítios secundários de metabolização e os metabólitos são excretados na urina e fezes (ONG; KHOO, 2000).

Recentemente, as aplicações terapêuticas dos flavonóides no tratamento e prevenção de doenças em humanos são demonstradas em vários estudos. Entre as aplicações médicas melhor documentadas dos flavonóides estão o uso no tratamento e prevenção de alergias, asma e inflamação. Os efeitos benéficos também estão relacionados em doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata diabética e cirrose (ONG; KHOO, 1996). Apresentam ainda, propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras, anti-trombóticas e antivirais (SAIJA et al., 1995; ONG; KHOO, 2000; SIMÕES et al., 2001; VESSAL et al., 2003).

Vários polifenóis naturais demonstram efeitos antidiabéticos e investigações do mecanismo de ação estão em desenvolvimento. Exemplos de flavonóides com ação anti-hiperglicêmica comprovados são: a (-)-epicatequina, que protege as ilhotas de Langerhans e promove a regeneração das células  $\beta$  nas ilhotas, estimula a liberação de insulina e normaliza os níveis de glicose sangüínea; a silimarina, com propriedades antioxidantes, atua protegendo as células  $\beta$  de danos oxidativos; a luteolina e o respectivo glicosídeo, que através da capacidade antioxidante e de seqüestro de radicais livres contribui para a regeneração das células  $\beta$ ; a quercetina atua normalizando os níveis de glicose plasmática, aumentando o conteúdo de glicogênio hepático, induzindo as enzimas glicoquinase e hexoquinase hepáticas e reduzindo as concentrações de colesterol e LDL no soro. Também atua na regeneração das ilhotas pancreáticas, aumentando o número de ilhotas funcionais e a liberação de insulina (ZARZUELO et al., 1996; SOTO et al., 1998; VESSAL et al., 2003). Ainda, a miricetina, com atividades antiinflamatória, anticarcinogênica, antiviral e antidiabética. Exerce a função hipoglicemiante mimetizando as ações da insulina, regulando os níveis glicêmicos e influencia no metabolismo e estoque de glicogênio hepáticos (ONG; KHOO, 1996, 2000).

## 1.2 VANÁDIO

O vanádio, membro do grupo VB da tabela periódica, de número atômico 23 e peso molecular 50,94 foi descrito pela primeira vez em 1801 pelo químico Andrés Manuel Del Rio, porém, ele só foi realmente descoberto em 1831 por um químico suéco, Nils Gabriel Sefström que lhe deu este nome em homenagem a “Vanadis”, deusa escandinava da beleza e fertilidade. O vanádio puro é um metal flexível, dúctil e brilhante sendo considerado o 22º elemento mais abundante na crosta terrestre (MUKHERJEE et al., 2004).

O vanádio está presente na crosta terrestre em concentrações de cerca de 0,015 g/kg, presente em combustíveis fósseis (petróleo, carvão) e em alguns campos petrolíferos. As concentrações nos solos são dependentes daquelas das rochas que a partir das quais eles foram formados e ficam entre 3 a 310 mg/kg. Os níveis de vanádio na água variam entre indetectáveis até 0,220 mg/L (WHO, 1988). O vanádio está presente também nos animais, sendo que os níveis teciduais na maioria dos vertebrados são muito baixos. Espécies marinhas, especialmente invertebrados como as várias espécies de tunicados da família *Ascididae*, possuem concentrações de vanádio teciduais maiores, (NRIAGU, 1998; WHO, 1988) por acumular este elemento a partir da água do mar. O vanádio entra no organismo destes invertebrados via canais de fosfato e sulfato, é reduzido a  $VO^{2+}$  e estocado em células especializadas, os vanadócitos (REHDER, 2003).

O vanádio também ocorre em pequenas quantidades em todas as plantas. Exemplo disso é o acúmulo de vanádio em espécies de cogumelos do gênero *Amanita*, como o *Amanita muscaria* o qual contém cerca de 100 vezes mais vanádio do que outras plantas armazenado na forma de um composto de baixo peso molecular chamado amavadina (WHO, 1988; REHDER, 2003).

Além da presença em células animais e vegetais, hoje são conhecidas algumas enzimas que possuem o vanádio como centro metálico nos sítios ativos. Estas enzimas são capazes de exercer atividades de nitrogenases como as presentes no gênero *Azotobacter* de bactérias fixadoras de nitrogênio, atividades de haloperoxidases que são encontradas em algas marrons e vermelhas (ex: *Ascophyllum nodosum*, *Corallina officinalis*) e em fungos como *Curvularia inaequalis* e ainda atuar como bromoperoxidases (REHDER, 2003; MUKHERJEE et al., 2004).

A principal fonte de ingestão de vanádio para a população em geral são os alimentos, que atingem concentrações na faixa de 0,1 – 10  $\mu\text{g/kg}$  (WHO, 1988). Alimentos ricos em vanádio incluem cogumelos, mariscos, sementes de endro,

salsa, pimenta preta, gelatina, ervilha verde, lentilhas, rabanetes, repolho, óleos vegetais como oliva e milho (MUKHERJEE et al., 2004).

Em mamíferos, o vanádio está presente como um elemento ultratraço e embora já existam relatos sobre sua essencialidade para o desenvolvimento de aves e roedores, pouco se sabe sobre as ações fisiológicas do mesmo. Em humanos, ainda deve ser determinado se esse elemento é considerado um componente essencial, sendo que a ingestão diária varia entre 10 – 60 µg, a concentração plasmática é aproximadamente 20 nM e a quantidade total no organismo é cerca de 100 – 200 µg (BRICHARD; HENQUIN, 1995; SHECHTER et al., 2003).

#### **1.2.1 Propriedades Químicas do Vanádio**

O vanádio, elemento de transição, forma estados de oxidação -1, 0, +2, +3, +4 e +5, sendo os estados +3, +4 e +5 os mais comuns (WHO, 1988). O vanádio tem uma química extremamente complexa, pois ele pode prontamente trocar o estado de oxidação e tornar-se uma forma catiônica ou aniônica. No estado +5, o vanádio existe como uma forma aniônica;  $\text{VO}_3^-$ , metavanadato ou  $\text{VO}_4^{3-}$ , ortovanadato. No estado +4, ele existe em uma forma catiônica;  $\text{VO}^{2+}$ , vanadil (figura 4) (BECKER et al., 1994; BRICHARD; HENQUIN, 1995; NRIAGU, 1998; SHECHTER et al., 2003).

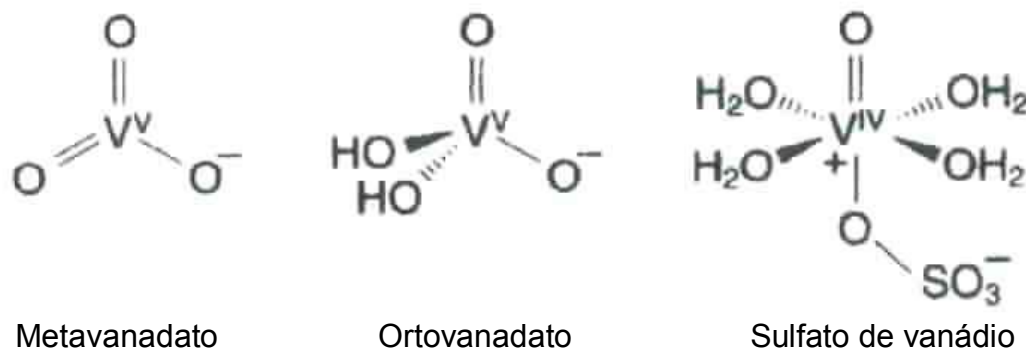


Figura 4. Estruturas químicas dos compostos de vanádio. Adaptado de BRICHARD; HENQUIN, 1995.

Sob condições fisiológicas, o estado pentavalente (+5) está na forma de ânion; vanadato: metavanadato ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  ou  $\text{VO}_3^-$ ) ou ortovanadato ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) e assemelha-se ao fosfato inorgânico ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) podendo atuar como um análogo de fosfato em sistemas biológicos (BRICHARD; HENQUIN, 1995; NRIAGU, 1998; SHECHTER et al., 2003). Em pH 7,4 o estado de oxidação tetravalente (+4) está na forma de cátion, o íon vanadil (oxovanádio  $\text{VO}^{2+}$ ) que é similar ao íon magnésio ( $\text{Mg}^{+2}$ ) e assim como a relação do vanadato com o fosfato também está apto a substituir o íon magnésio em muitos sítios de ação celulares e bioquímicos. A ação biológica diversa do vanádio e a habilidade em ser um metal eletronegativo ou eletropositivo resultam da capacidade de funcionar como oxiânion, oxicátion ou pró-oxidante, gerando uma grande variedade de compostos químicos (NECHAY, 1984; BRICHARD; HENQUIN, 1995; SHECHTER et al., 2003).

Os compostos de coordenação de vanádio apresentam comumente geometria octaédrica, pirâmide de base quadrada e bipirâmide trigonal, com um átomo de oxigênio que forma dupla ligação com o cátion V(IV) e V(V) conforme a figura 5. Este oxigênio se conhece como “oxo” e os compostos são denominados de oxovanadila e oxovanadato dependendo do estado de oxidação ( GARCIA, 1996).



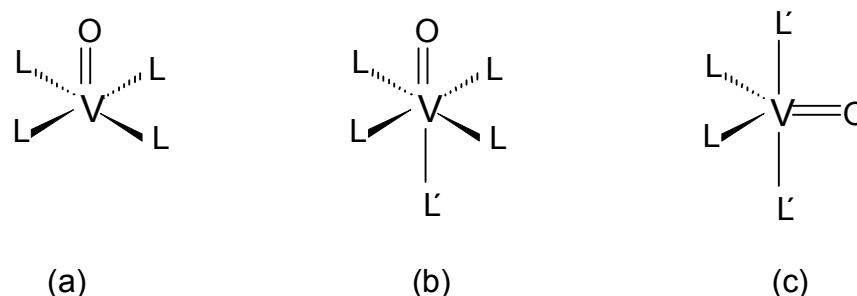


Figura 5. Geometrias de coordenação mais comuns dos compostos de vanádio (IV) e (V). (a) Pirâmide de base quadrada; (b) Octaedro distorcido tetragonalmente; (c) Bipirâmide trigonal. L e L' são ligantes diferentes.

### 1.2.2 Propriedades Biológicas do Vanádio

No passado, os compostos de vanádio eram amplamente usados como agentes terapêuticos (para anemia, tuberculose, cáries dentais e diabetes), como anti-séptico e como tônico (NRIAGU, 1998; SHECHTER et al., 2003). Os usos farmacológicos do vanádio incluem a redução dos níveis de colesterol, triglicerídeos e glicose, efeitos diuréticos e natriuréticos, contração dos vasos sanguíneos, aumento da afinidade por oxigênio da hemoglobina e mioglobina, efeito anticarcinogênico (THOMPSON et al., 1993; NRIAGU, 1998). Porém, a função biológica de maior destaque é a de imitar a insulina.

A absorção e distribuição dos compostos de vanádio dependem da rota de entrada e da solubilidade dos mesmos nos fluidos corporais (WHO, 1988). O vanádio absorvido é transportado principalmente no plasma e estima-se que 90% do vanádio total esteja ligado a proteínas (MUKHERJEE et al., 2004). Ambas as formas, vanadato (ligado a transferrina) e vanadil (ligado a albumina e transferrina) são rapidamente transportados a vários tecidos. Como outros íons metálicos em sistemas biológicos, o vanádio geralmente encontra-se ligado a transferrina, hemoglobina, albumina, glutathione e outros compostos de baixo peso molecular (NRIAGU, 1998; BARAN, 2000; SHECHTER et al., 2003).

Desde que a absorção do vanádio no trato gastrointestinal é muito precária, a grande maioria do vanádio ingerido é eliminado pelas fezes (WHO, 1988; NRIAGU, 1998; BARAN, 2000; MUKHERJEE et al., 2004). Porém quando administrado por via parenteral, somente 10% do vanádio é encontrado nas fezes de humanos e ratos (MUKHERJEE et al., 2004). A principal rota de excreção do vanádio absorvido é através dos rins mas além da excreção renal, parte do vanádio absorvido também pode ser excretado na bile (WHO, 1988; NRIAGU, 1998; MUKHERJEE et al., 2004).

Sob condições fisiológicas, pouco vanádio é retido no organismo e a quantidade absorvida é convertida a uma forma química comum, sendo a distribuição nos órgãos independente do estado de oxidação e da natureza química da forma do composto originalmente administrada (BARAN, 2000). Entretanto, estudos em animais sugerem que o acúmulo do vanádio, provavelmente ligado a pequenos peptídeos ou a macromoléculas na forma de íon vanadil, possa estar relacionado diretamente com a dose administrada (NRIAGU, 1998).

Em geral, os níveis teciduais de elementos traço refletem a taxa de ingestão, biodisponibilidade e excreção até níveis suficientemente altos para superar a regulação homeostática, quando então possíveis efeitos tóxicos podem aparecer (NRIAGU, 1998). A dose letal do vanádio é altamente dependente das espécies, idade e dieta. Em ratos, foram determinados os níveis de  $DL_{50}$  de 0,15 mmol/kg e 0,8 mmol/kg para o metavanadato de sódio administrado via intraperitoneal e via oral, respectivamente; 0,3 mmol/kg e 1,8 mmol/kg para o sulfato de vanadila pentahidratado via intraperitoneal e via oral, respectivamente (NRIAGU, 1998; MUKHERJEE et al., 2004).

A toxicidade do vanádio também varia de acordo com a via de administração utilizada. É considerada baixa quando o composto é administrado

via oral devido à precária absorção no trato gastrointestinal, moderada quando inalado e alta quando administrado via parenteral. Como regra, a toxicidade dos compostos de vanádio aumenta com o aumento da valência, sendo o vanádio pentavalente a forma mais tóxica (BRICHARD; HENQUIN, 1995; NRIAGU, 1998; MUKHERJEE et al., 2004).

Em animais diabéticos tratados cronicamente com vanádio via oral, a concentração plasmática do elemento atingiu cerca de 20  $\mu\text{M}$ , ou seja, 1000 vezes maior do que nos controles. Mesmo concentrações mais altas podem ser atingidas em tecidos nos quais o vanádio pode se acumular como ossos e rins. O efeito colateral mais óbvio do tratamento com vanádio é a redução no ganho de peso (BRICHARD; HENQUIN, 1995). No entanto, apesar da toxicidade, estes compostos são conhecidos pelas propriedades insulino-miméticas *in vitro* e *in vivo* e podem tornar-se úteis no futuro para o tratamento do diabetes. A primeira demonstração que o vanádio poderia influenciar um sistema biológico data de antes de 1977, quando os efeitos inibitórios *in vitro* sobre a atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase foram descritos (CANTLEY, et al., 1977). Mais tarde, o vanádio foi confirmado como um forte inibidor da  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase e  $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase sendo que ambas as enzimas tem importantes papéis metabólicos. Heyliger em 1985 demonstrou que ratos diabéticos quando tratados oralmente com vanadato tinham os níveis de glicose sangüínea reduzidos a valores normais dentro de 2 a 5 dias.

Na célula, o vanadato pode afetar processos de fosforilação e desfosforilação de proteínas, regular muitas atividades de enzimas e participar na geração de radicais livres. A fosforilação de proteínas pelas quinases e a desfosforilação pelas fosfatases são reações chaves envolvidas na regulação do metabolismo celular, proliferação e diferenciação. O vanadato inibe a atividade de fosfotirosina fosfatases e estimula tirosina quinases, levando a um acúmulo de fosfotirosinas em várias proteínas celulares (NRIAGU, 1998; GOLDWASER et al., 2000a). Além disso, o vanadato inibe várias enzimas metabólicas chaves no fígado, músculo e tecido adiposo, todas as quais atuam coletivamente permitindo

a utilização ou armazenamento da glicose que entra na célula bem como bloqueia as ações dos hormônios que se opõem a ação da insulina (SHECHTER et al., 2003).

O vanadato também pode estimular uma variedade de enzimas incluindo adenilato ciclase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, NADPH oxidase, tirosina fosforilase, glicogênio sintase, lipoproteína lipase, fosfoglicomutase, glicose-6-fosfato desidrogenase e citocromo oxidase. Além disso, pode exercer efeitos inibitórios sobre algumas enzimas como ATPases, adenilato quinase, fosfofrutoquinase, glicose 6-fosfato desidrogenase, ribonuclease, esqualeno sintetase e proteínas fosfatases (NRIAGU, 1998).

Os sais de vanádio mimetizam a maioria dos efeitos rápidos (metabólicos) da insulina. Em adipócitos os compostos de vanádio estimulam a captação de hexose através do recrutamento dos GLUTs para a membrana plasmática e promovem a oxidação da glicose. (PAQUET, et al., 1992; NRIAGU, 1998; GOLDWASER et al., 2000b; SHECHTER et al., 2003). Em hepatócitos o vanádio acelera a glicólise e a síntese de glicogênio, inibe a gliconeogênese e glicogenólise hepáticas (BOSCH, et al., 1990; MILRAPEIX, et al., 1991; NRIAGU, 1998; SHECHTER et al., 2003). Em músculos, o vanádio e a insulina produzem mudanças similares qualitativamente no metabolismo da glicose, mas a magnitude pode diferir dependendo da via metabólica. O vanadato aumenta a captação de glicose, síntese de glicogênio e a glicólise em uma extensão menor que a insulina, mas causa maior estimulação da oxidação da glicose e do lactato (BRICHARD; HENQUIN, 1995).

A literatura sugere que o vanádio atue através de uma via alternativa à insulina, envolvendo a inibição de proteínas fosfotirosina fosfatase e a ativação de proteínas tirosina quinases não receptor (GOLDWASER et al., 2000 a e b).

Uma proteína tirosina quinase citosólica (citPTK) de peso molecular 53 KDa foi identificada como sítio potencial de ação do vanadato, uma vez que a atividade da citPTK foi aumentada 3-5 vezes após o tratamento dos adipócitos de rato com vanadato (SHISHEVA; SHECHTER, 1991, 1993a; NRIAGU, 1998; GOLDWASER et al., 2000b). Sugeriu-se que os efeitos biológicos estimulados pelo vanadato como a lipogênese e a oxidação da glicose poderiam, pelo menos em parte, ser mediados pela PTK citosólica em um modelo independente da proteína tirosina quinase do receptor da insulina (SHISHEVA; SHECHTER, 1991, 1993a).

Recentemente também foi identificada uma proteína tirosina quinase ativada pelo vanadato de localização exclusiva na membrana (membPTK). Esta parece participar dos efeitos do vanadato que não são mediados pela citPTK, como a inibição da lipólise e captação de hexoses, e bem como a ativação da PI-3-K (SHISHEVA; SHECHTER, 1991, 1993a ; GOLDWASER et al., 2000b).

Os estudos das últimas décadas apontam que as ações antidiabéticas do vanádio podem ser atribuídas: 1) inibição de proteínas fosfotirosina fosfatases e ativação de proteínas tirosina quinases não receptor; 2) inibição de várias outras enzimas que participam no metabolismo de glicose e gordura, como frutose-2,6-bisfosfatase, glicose-6-fosfatase e lipase hormônio sensível; 3) aumento ou redução nos níveis de RNAm da piruvatoquinase tipo L e da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, respectivamente (SHECHTER et al., 2003).

Em consideração a provável necessidade de administração a longo prazo dos compostos de vanádio para o alívio dos sintomas diabéticos, numerosos agentes são investigados como candidatos para tratamentos antidiabéticos (BRICHARD; HENQUIN, 1995; NRIAGU, 1998; THOMPSON et al., 2004). Vários compostos de vanádio quelados organicamente são mais potentes do que os sais livres em facilitar os efeitos insulino-miméticos *in vitro* e *in vivo*. Em geral, para que um ligante e o vanádio atuem sinergisticamente, particularmente *in vivo*, certos requerimentos devem ser preenchidos. O mais crucial é a cinética apropriada de

complexação e descomplexação, a qual assegura a liberação e forma adequada do íon metal-óxido associado a sítios chaves do metabolismo da glicose (GOLDWASER et al., 2000a).

Estes compostos parecem ter em comum a propriedade de aumentar a permeação nos tecidos por difusão passiva e correspondentemente, aumentada eficiência insulino-mimética com pouco ou nenhuma redução nos níveis de toxicidade destes metal-óxidos. A pesquisa está sendo direcionada na busca de ligantes que: (a) tenham índices negligenciáveis de toxicidade; (b) sejam capazes de atravessar membranas plasmáticas (livres ou complexados ao vanádio) utilizando sistemas de transporte de ocorrência natural e; (c) não necessariamente aumentem a permeação do vanádio nos tecidos mas sejam capazes de converter o vanádio intracelular já presente em espécies insulino-miméticas ativas (SHECHTER et al., 2003).

Vários complexos orgânicos de vanádio estão sendo investigados em modelos animais de diabetes. Alguns exemplos são: bis(maltolato)oxovanádio (IV) (BMOV), o derivado etil do BMOV, bis(picolinato)oxovanádio (IV), bis(metformina)oxovanádio (IV), bis(acetilacetato)oxovanádio (IV) ( $\text{VO}(\text{acac})_2$ ) e bis (3-etil-acetilacetato)oxovanádio (IV) ( $\text{VO}(\text{Et-acac})_2$ ). Estes estudos demonstram também que os complexos  $\text{VO}(\text{acac})_2$  e  $\text{VO}(\text{Et-acac})_2$  tem efeitos insulino-miméticos a longo prazo e são tão efetivos quanto BMOV em animais diabéticos (CRANS, 2000).

Setyawati, em estudo realizado em 1998 com o complexo bis(maltolato)oxovanádio(IV) (BMOV) demonstrou que o BMOV é efetivo em diminuir a glicemia em doses mais baixas (0,006 – 0,012 mmol/animal) do que o sulfato de vanadila (0,009 – 0,010 mmol/animal) e não mostra evidências de toxicidade após um período de 6 meses de administração em ratos diabéticos. Ambas as vias de administração, oral e intraperitoneal, indicam que o BMOV é

duas a três vezes mais potente do que o sulfato de vanadila em reduzir a glicose sangüínea no diabetes experimental.

Recentes estudos realizados por Willsky e colaboradores com o complexo BMOV [VO(malto)<sub>2</sub>] sugerem que o BMOV melhorou a absorção gastrointestinal e conseqüentemente diminuiu a dose de vanádio requerida para a efetiva redução da glicemia em animais diabéticos. Quando o VO(malto)<sub>2</sub> e sulfato de vanadila foram administrados uma única vez por via intraperitoneal em roedores, o sulfato de vanadila não teve efeitos significativos na redução da glicose sangüínea. Em contraste, o VO(malto)<sub>2</sub>, reduziu substancialmente a glicose plasmática (WILLSKY et al., 2001).

Recentemente foi descoberto que o isômero L do glu(γ) monohidrixamato(HXM) é particularmente ativo; em ratos diabéticos o complexo L-glu(γ)HXM – vanádio (estequiometria 2:1) potencializou a normalização dos níveis de glicose sangüínea induzida por vanádio cerca de 4 a 5 vezes (GOLDWASER et al., 2000a).

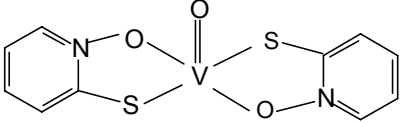
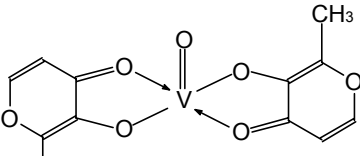
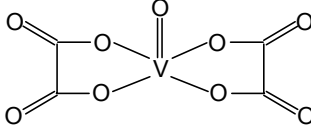
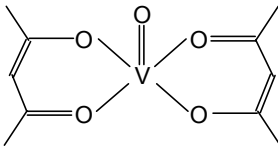
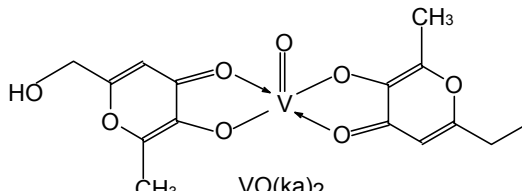
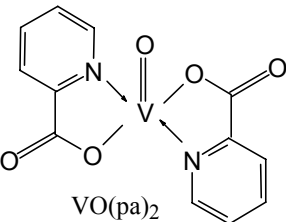
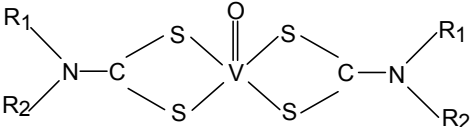
A complexação do vanádio com fármacos antidiabéticos já conhecidos como as biguanidas, na expectativa de obter-se efeitos aditivos ou sinérgicos estão sendo desenvolvidos. A administração aguda (72 h) via oral e intraperitoneal do complexo bis(metformina)oxovanádio (IV) [VO(metf)<sub>2</sub>] em ratos diabéticos resultou em redução significativa dos níveis de glicose; contudo, nenhum efeito associativo positivo devido à presença da biguanida no complexo foi aparente (WOO et al., 1999).

Com base na literatura, foi proposta uma escala crescente do efeito hipoglicemiante dos complexos de vanádio com compostos orgânicos sintéticos em ratos diabéticos: VO(malto)<sub>2</sub> > VO(cysm)<sub>2</sub> > VO(tar)<sub>2</sub> > VO(sal)<sub>2</sub> > VO(ox)<sub>2</sub>. Através da tabela 1 é possível notar que o modo de coordenação do vanádio influencia na atividade (SAKURAI et al., 2002). Entretanto, pouco se sabe a cerca

das propriedades de coordenação dos compostos de vanádio administrados oralmente *in vivo* em função dos fatores requeridos para a liberação do vanádio aos sítios finais de ação, ou na localização deste sítio de ação. Descobrir uma relação clara entre a estrutura do complexo e a atividade insulino-mimética ainda é muito difícil, dada a interrelação de muitos fatores importantes envolvendo caracteres físico-químicos e fisiológicos como a estabilidade e a carga eletrônica em valores de pH fisiológico, hidro ou lipofilicidade, disponibilidade para absorção no trato gastrointestinal, distribuições do vanádio em órgãos e células e a toxicidade e segurança do efeito do complexo (NRIAGU, 1998).



Tabela 1. Complexos de vanádio com diferentes modos de coordenação que apresentam atividade hipoglicêmica em ratos diabéticos.

Modo de Coordenação	Complexo
$S_2O_2$	 <p style="text-align: center;"><math>VO(opt)_2</math></p>
$O_4$	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p><math>VO(mal)_2</math> ou BMOV</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><math>VO(ox)_2</math></p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p><math>VO(acac)_2</math></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><math>VO(ka)_2</math></p> </div> </div>
$N_2O_2$	<div style="text-align: center;">  <p><math>VO(pa)_2</math></p> </div>
$S_4$	<div style="text-align: center;">  </div> <div style="display: flex; justify-content: flex-end; margin-top: 10px;"> <p><math>VO-PYD: R_1 = -CH_2CH_2-</math></p> <p><math>VO-SAD: R_1 = -CH_3</math></p> <p><math>R_2 = -CH_2COO-</math></p> </div>

Adaptado de SAKURAI et al., 2002.

### 1.3 DIABETES MELITO

Diabetes é uma doença complexa e multifatorial, considerada um dos mais importantes problemas de saúde mundial e está associada com significativa mortalidade, morbidade e perda da qualidade de vida. É caracterizada por distúrbios no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, causados por absoluta ou relativa deficiência da secreção e/ou ação da insulina e que tem como aspecto fundamental a hiperglicemia (GILMAN et al., 1991; ISLAS-ANDRADE et al., 2000; CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES, 2002; RAO et al., 2003).

A classificação atualmente recomendada apóia-se na etiologia do diabetes melito e o classifica em tipo I ou insulino-dependente (IDDM) e tipo II ou não insulino-dependente (NIDDM) (GILMAN et al., 1991; NORMAN; LITWACK, 1997; CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES, 2002). O diabetes melito tipo I é uma doença auto-imune mediada por células T onde as células  $\beta$  pancreáticas são destruídas por auto-anticorpos direcionados para antígenos de membrana, de citoplasma da célula ou contra a própria insulina e caracteriza-se pela ausência de secreção endógena de insulina (GILMAN et al., 1991; PIÑERO-PILOÑA; RASKIN, 2001; CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES, 2002; ROSMALEN et al., 2002;). Essa deficiência leva a redução da captação periférica da glicose bem como à incapacidade de suprimir a produção hepática de glicose, resultando em hiperglicemia (BEARDSALL et al., 2003).

A patogênese clássica do diabetes melito tipo II envolve resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina, marcada por hiperinsulinemia compensatória e disfunção das células  $\beta$  marcada por declínio da secreção de insulina e hiperglicemia (LEROITH, 2002; VAN HAEFTEN, 2002; KASLAUSKAITE; FOGELFELD, 2003; BEARDSALL et al., 2003). É a forma prevalente de diabetes, sendo mais comumente diagnosticada em adultos com mais de 40 anos. (CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES, 2002; VAN HAEFTEN, 2002). São considerados importantes variáveis para o aumento da prevalência do

diabetes fatores como: a idade e o aumento da expectativa de vida, sexo, estilo de vida, sedentarismo e obesidade (VENKAT et al., 2000; GADSBY, 2002).

Em 1985, cerca de 30 milhões de pessoas no mundo eram consideradas diabéticas. Em 1995, esse número passou para 135 milhões (4% da população mundial). Existem atualmente cerca de 151 milhões de pessoas com idades entre 20 e 79 anos com diabetes clinicamente diagnosticado. A maioria dos casos de diabetes melito (DM) é do tipo II e cerca de 4,9 milhões de pessoas abaixo dos 20 anos sofre de DM tipo I (VENKAT et al., 2000; GADSBY, 2002). Até o ano de 2010, são esperados aumentos de 82% na América Latina, 93% na África, 111% na Ásia, 51% na Europa e 35% na América do Norte no número de casos de diabetes. Projeções indicam que podem haver 300 milhões de diabéticos no ano de 2025 (VENKAT et al., 2000; GADSBY, 2002).

### **1.3.1 Insulina**

A insulina é um hormônio polipeptídico sintetizado nas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans no pâncreas. É composta por 51 aminoácidos dispostos em duas cadeias, A e B unidas entre si por duas pontes dissulfeto (BANTING, et al., 1992; LE FLEM et al., 2002). A síntese ocorre a partir de um precursor de 110 aminoácidos, a pré-pró-insulina no retículo endoplasmático onde é clivada a pró-insulina. Esta, no complexo de golgi, é convertida à insulina e armazenada em vesículas (GILMAN et al., 1991; NORMAN; LITWACK, 1997). A secreção de insulina é um processo estritamente regulado graças à interação coordenada de vários nutrientes, hormônios gastrointestinais, pancreáticos e neurotransmissores (GILMAN et al., 1991; ROLLAND et al., 2001; BEARDSALL et al., 2003). A manutenção da homeostasia da glicose é atingida pela regulação hormonal da captação e produção endógena de glicose, primariamente pelo músculo e fígado (GÖKE, 1998; BEARDSALL et al., 2003).

A glicose, o principal secretagogo da insulina, estimula a secreção do hormônio muito mais eficientemente quando administrada por via oral do que através da via endovenosa. A ingestão de glicose (alimento) induz a liberação de hormônios gastrointestinais como a gastrina, secretina e colecistocinina além de estimular a atividade vagal que também ativa a secreção de insulina disponibilizando-a no plasma ou no sangue segundos antes da glicose proveniente da dieta aumentar a glicemia (BRELJE; SORENSON, 1988; GILMAN et al., 1991; BEARDSALL et al., 2003; MOORE et al., 2003). Quando estimulada por glicose, a secreção de insulina é bifásica (figura 6). A primeira fase alcança um pico máximo entre 1 e 2 minutos após a ingestão é de curta duração e representa a liberação da insulina armazenada na célula. A segunda fase é mais tardia porém com duração mais longa sendo mantida pela biossíntese do hormônio (GILMAN et al., 1991; NORMAN; LITWACK, 1997; BEARDSALL et al., 2003; MOORE et al., 2003). A meia-vida da insulina circulante é de 3 a 5 minutos e o metabolismo ocorre principalmente no fígado e rim por ação de insulinasas (BRELJE; SORENSON, 1988; GILMAN et al., 1991; NORMAN; LITWACK, 1997; BEARDSALL et al., 2003).

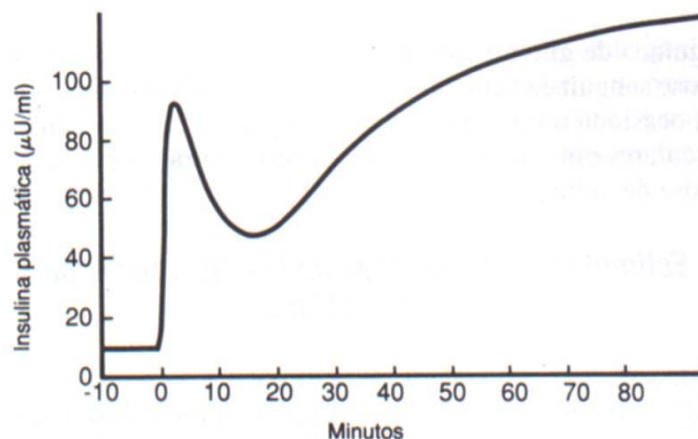


Figura 6. Secreção bifásica da insulina estimulada por glicose na circulação sanguínea. Adaptado de GUYTON; HALL, 1998.

Nas células  $\beta$ , a sinalização da glicose com a conseqüente liberação de insulina, requer primeiro o metabolismo da glicose (ROLLAND et al., 2001). Uma vez captada pela célula através de difusão facilitada pelo GLUT2, a glicose é

fosforilada a glicose 6-fosfato (G-6P) pela glicoquinase e então oxidada. Ocorre um aumento da relação ATP/ADP gerando um fechamento dos canais de potássio ( $K^+$ ) sensíveis a ATP e a despolarização da membrana. Essa despolarização ativa canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) dependentes de voltagem o que aumenta o influxo de  $Ca^{2+}$  para dentro da célula. O resultado final desta elevação nos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  é a liberação da insulina armazenada (GILMAN et al., 1991; NORMAN; LITWACK, 1997; ROLLAND et al., 2001; LEROITH, 2002; OIKININE; MOORADIAN, 2003).

A insulina exerce diversos efeitos fisiológicos através da fosforilação de proteínas, resultando em aumento do transporte de glicose, mitogênese e/ou regulação de vias enzimáticas e metabólicas (NYSTROM; QUON, 1999; KLOVER; MOONEY, 2004).

A insulina induz os efeitos biológicos pela interação com um receptor específico de membrana. Este receptor é uma glicoproteína heterotetramérica sendo, 2 unidades  $\alpha$  extracelulares que contêm o sítio de ligação para insulina unidas por pontes dissulfeto e 2 unidades  $\beta$  intracelulares que possuem os domínios de tirosina quinases (NORMAN; LITWACK, 1997; NYSTROM; QUON, 1999; LE FLEM et al., 2002; PERTSEVA et al., 2003). Após a ligação da insulina na subunidade  $\alpha$  do receptor, ocorre a autofosforilação de resíduos tirosina quinase na subunidade  $\beta$  tornando-se uma proteína quinase ativada (HEI, 1998; WATSON; PESSIN, 2001; PERTSEVA et al., 2003; KLOVER; MOONEY, 2004). A seguir, o receptor ativado dá início a cascatas de fosforilação de várias outras proteínas e enzimas intracelulares, como a família de substratos para receptor de insulina (IRS- 1 e 2) que servem como âncoras para outras proteínas efetoras, através da transdução de sinal (GILMAN et al., 1991; NORMAN; LITWACK, 1997; HEI, 1998; WATSON; PESSIN, 2001; PERTSEVA et al., 2003; KLOVER; MOONEY, 2004). Também, realiza a ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI-3-K), considerada importante para a translocação dos transportadores de glicose (GLUT4) para a membrana e consequente captação de glicose (figura 7)

(NORMAN; LITWACK, 1997; HEI, 1998; NYSTROM; QUON, 1999; WATSON; PESSIN, 2001).

Há no mínimo três mecanismos pelos quais a insulina poderia modular a função do GLUT4 e aumentar a captação de glicose: 1) alteração da atividade intrínseca de transporte dos GLUT4 pré-existentes para a membrana; 2) aumento da expressão de proteínas GLUT4 por elevação da biossíntese ou redução da degradação; 3) aumento da translocação das vesículas intracelulares pré-existentes que contêm os transportadores GLUT4 (WATSON; PESSIN, 2001).

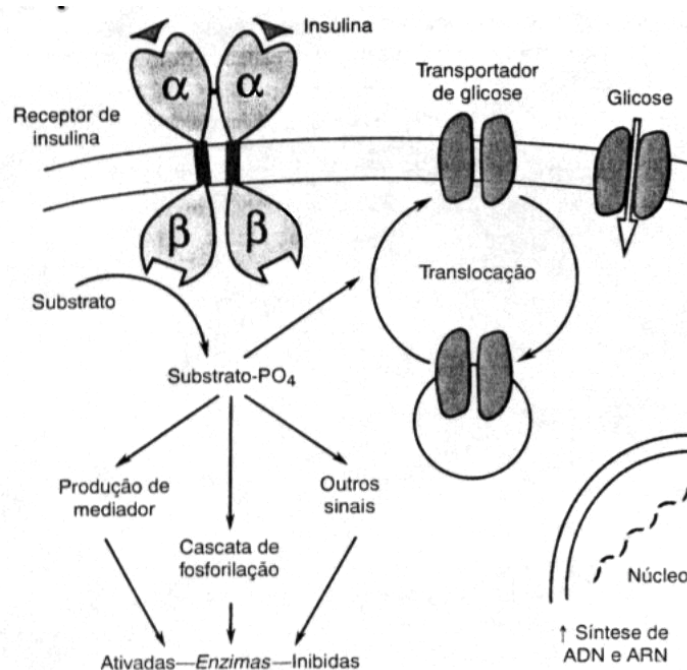


Figura 7. Ilustração esquemática do modo de ação da insulina na regulação da captação de glicose em tecidos dependentes de insulina. Adaptado de Gilman et al., 1991.

### 1.3.2 Regulação do Metabolismo da Glicose

A fim de manter o equilíbrio energético do organismo, uma alimentação adequada contendo carboidratos, proteínas e lipídios é essencial. Contudo, isto não é um processo contínuo e o organismo dispõe de reservas energéticas para

períodos de jejum mais prolongados (BURTIS; ASHWOOD, 1996; BEARDSALL et al., 2003). A glicose é a principal fonte de energia para o organismo humano, sendo o combustível preferencial utilizado por alguns tecidos como o cérebro e eritrócitos (BEARDSALL et al., 2003).

A insulina é um hormônio essencial que regula o metabolismo, crescimento e diferenciação celular atuando em diversos tecidos, principalmente fígado, músculo e tecido adiposo (NYSTROM; QUON, 1999; BEARDSALL et al., 2003). Dessa forma, a homeostasia da glicose é mantida dentro de limites estreitos através de três processos intimamente associados, utilização da glicose pelos tecidos periféricos, produção hepática de glicose e secreção de insulina pelo pâncreas (GILMAN et al., 1991; NYSTROM; QUON, 1999; ZIERATH; KAWANO, 2003).

De maneira geral, as ações anabólicas da insulina incluem a estimulação da captação, utilização e armazenamento intracelular de glicose, aminoácidos e ácidos graxos e inibição de processos catabólicos como glicogenólise, lipólise e proteólise (GILMAN et al., 1991).

Após uma refeição, quando os níveis de glicose sangüínea estão aumentados, a hiperglicemia sinaliza às células  $\beta$  para produzir e liberar insulina e suprimir a liberação de glucagon pelas células  $\alpha$  (NYSTROM; QUON, 1999; LEROITH, 2002; ZIERATH; KAWANO, 2003).

Os níveis de insulina aumentados estimulam a captação de glicose insulino-dependente no músculo. O índice de captação de glicose no músculo depende da ação da insulina sobre os transportadores de glicose, GLUT4. No repouso, esses transportadores estão localizados em vesículas intracelulares, mas quando a insulina liga-se ao receptor de membrana, os GLUT4 são translocados para a membrana aumentando a captação da glicose pela célula. (VAN HAEFTEN, 2002; LEROITH, 2002; BEARDSALL et al., 2003).

O estímulo da insulina através de receptores musculares aumenta a captação de glicose e a síntese de glicogênio muscular pela ativação da glicogênio sintase (NORMAN; LITWACK, 1997). Além disso, a insulina também aumenta a captação de aminoácidos e conseqüentemente a síntese de proteínas (HEI, 1998).

Níveis elevados de glicose e insulina na circulação também ativam a captação e o metabolismo de glicose e a lipogênese no tecido adiposo, inibem a lipólise e dessa forma, reduzem os ácidos graxos livres no plasma (BEARDSALL et al., 2003).

O fígado desempenha um papel fundamental na homeostasia da glicose. No período pós-prandial, o fígado remove glicose da circulação através dos transportadores. Quando a glicose entra na célula ela é fosforilada pela hexoquinase e glicoquinase em glicose 6-fosfato (GILMAN et al., 1991; KLOVER; MOONEY, 2004) que pode entrar na via glicolítica e gerar ATP ou quando em excesso ser transformada em triglicerídios (BEARDSALL et al., 2003). Na presença de insulina no sangue, ocorre inibição da gliconeogênese e glicogenólise levando à supressão da produção hepática de glicose, ativação da lipogênese hepática, aumento da síntese de glicogênio e da oxidação total da glicose até  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (figura 8) (NORMAN; LITWACK, 1997; VAN HAEFTEN, 2002; BEARDSALL et al., 2003; KLOVER; MOONEY, 2004).

Durante o jejum, os níveis de insulina na circulação sangüínea diminuem enquanto o glucagon e outros hormônios contra-regulatórios aumentam (LEROITH, 2002; BEARDSALL et al., 2003; ZIERATH; KAWANO, 2003; KLOVER; MOONEY, 2004).

O glucagon atua primariamente aumentando a quebra de glicogênio, bem como, estimulando a gliconeogênese. O fígado é o órgão primário responsável pela gliconeogênese, mas após um jejum prolongado (ser humano, 18 h para



depleção total do glicogênio hepático), o rim também pode contribuir para a produção de glicose. Embora os níveis de glicose plasmática sejam inicialmente mantidos pela glicogenólise hepática, o glicogênio estocado esgota-se e a contribuição da gliconeogênese a partir de glicerol, lactato e aminoácidos aumenta progressivamente (BEARDSALL et al., 2003; ZIERATH; KAWANO, 2003; KLOVER; MOONEY, 2004).

No estado de jejum, os tecidos independentes de insulina para a captação de glicose como o cérebro e eritrócitos são responsáveis pela maioria da remoção e utilização da glicose sanguínea, enquanto os tecidos insulino-dependentes, principalmente o músculo, utilizam somente cerca de 25% da glicose circulante. A homeostasia da glicose é obtida pela liberação desta glicose a partir do fígado em quantidades equivalentes à utilização pelos tecidos periféricos (ZIERATH; KAWANO, 2003).

Quando a insulina plasmática está diminuída, após um jejum ou na ausência de exercícios, a captação de glicose pelo músculo também é reduzida, e este se torna altamente dependente da oxidação de ácidos graxos para obter energia (NORMAN; LITWACK, 1997; MOORE et al., 2003). Além disso, ocorre aumento da glicogenólise e da proteólise muscular. O lactato produzido no músculo e eritrócitos pela glicólise anaeróbica além dos aminoácidos obtidos pela proteólise são transportados ao fígado onde podem ser utilizados como precursores gliconeogênicos (BEARDSALL et al., 2003). No tecido adiposo, ocorre ativação da lipólise com aumento da liberação de ácidos graxos e glicerol que servem como precursores da gliconeogênese e da cetogênese hepáticas. Os corpos cetônicos liberados servem como fonte alternativa de energia para os tecidos periféricos durante o jejum (NORMAN; LITWACK, 1997; BEARDSALL et al., 2003).

A insulina é o hormônio mais importante que regula o metabolismo energético. Uma deficiência relativa ou absoluta, como no caso do diabetes, leva a

severas disfunções nos principais órgãos alvos da insulina, isto é, fígado, tecido adiposo e músculo (HEI, 1998). Quando a insulina está ausente, ocorre aumento nos níveis glicêmicos, redução da captação de glicose nos tecidos, redução da síntese protéica e da lipogênese, bem como, ativação da produção hepática de glicose. Também há um aumento da lipólise no tecido adiposo com conseqüente elevação dos ácidos graxos no plasma (BEARDSALL et al., 2003).

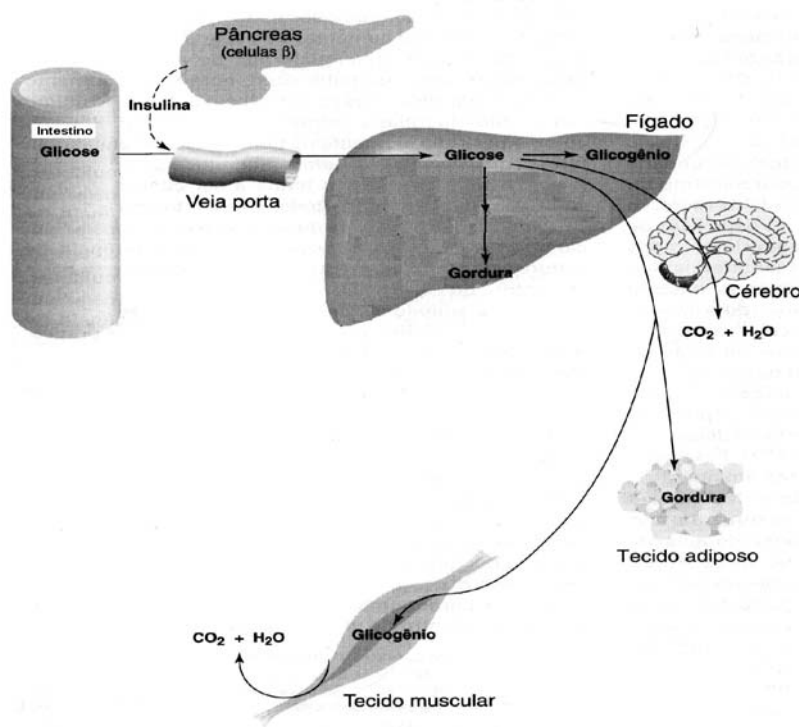


Figura 8. Metabolismo da glicose no estado bem alimentado. Adaptado de Devlin, 1997.

### 1.3.3 Terapia Insulínica

Em geral, quando um adequado controle glicêmico não é obtido com as dietas, exercícios e hipoglicemiantes orais, faz-se necessário a adoção da terapia com insulina exógena como alternativa para o controle da glicemia (GILMAN et al., 1991; PILLAI; PANCHAGNULA, 2001).

A administração de insulina por via subcutânea consiste no tratamento primário para todos os pacientes com DM tipo I e vários pacientes com DM tipo II (GILMAN et al., 1991; PILLAI; PANCHAGNULA, 2001). Porém esta via de administração subcutânea da insulina difere da secreção fisiológica em pelo menos dois fatores: 1) não mimetiza a cinética de elevação rápida e declínio normais da insulina em resposta ao alimento ingerido e, 2) difunde-se dentro da circulação periférica em vez de ser liberada na circulação porta, perdendo o efeito preferencial nos processos metabólicos hepáticos (GILMAN et al., 1991; PILLAI; PANCHAGNULA, 2001; KASLAUSKAITE; FOGELFELD, 2003).

As preparações insulínicas são classificadas de acordo com a concentração, pureza, tipo e origem. Quanto à origem, pode ser bovina, suína ou humana. As diferenças entre elas são mínimas, atendo-se a alterações em 1 (suína) ou 3 (bovina) aminoácidos da cadeia. A insulina humana é amplamente utilizada em função do desenvolvimento de técnicas de ADN recombinante. No que diz respeito ao tipo de insulina, a classificação é feita pelo início de ação e pico máximo de atividade. As insulinas de ação curta são utilizadas pouco antes das refeições, apresentam início de ação rápido, aproximadamente 15 minutos, e menor duração, grupo em que está incluída a insulina regular. Já a insulina de ação intermediária apresenta um período de ação mais longo, sendo a forma mais utilizada a insulina NPH (insulina com protamina neutra de Hagedorn). As insulinas de ação ultralenta têm início de ação muito lento e os níveis plasmáticos mantêm-se durante todo o dia. São muito utilizadas as combinações de insulina lenta x ultralenta ou regular x NPH, a fim de obter combinações de início rápido e ação prolongada ou ainda início tardio e ação prolongada, respectivamente, conforme a necessidade de cada paciente (GILMAN et al., 1991; KASLAUSKAITE; FOGELFELD, 2003).

Ainda que efetiva, a terapia insulínica apresenta o desconforto das injeções subcutâneas diárias, o que muitas vezes dificulta a adesão ao tratamento. Alternativas promissoras são as pesquisas envolvendo o desenvolvimento de

novos agentes hipoglicemiantes que sejam ativos por via oral visando amenizar o sofrimento dos pacientes diabéticos.

#### **1.3.4 Hipoglicemiantes Orais**

Pacientes diabéticos freqüentemente apresentam um modelo complexo de anormalidades metabólicas e fisiológicas incluindo hiperglicemia, hipertensão, obesidade e hiperinsulinemia. O tratamento desses pacientes envolve primariamente dieta e o controle de peso (INZUCCHI, 2002).

Quando um adequado controle glicêmico não é obtido através da dieta e exercícios, os pacientes fazem uso dos agentes hipoglicemiantes orais para o controle da glicemia. Esses medicamentos são divididos em grupos que estimulam a secreção da insulina como por exemplo, os mais usados: as sulfoniluréias e as metiglinidas e, os que aumentam a sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina como as biguanidas e as tiazolidinodionas. E ainda, os hipoglicemiantes que atuam inibindo a absorção de carboidratos no intestino (OIKININE; MOORADIAN, 2003).

## 2 JUSTIFICATIVA

Ainda que na maioria das vezes sem comprovação científica, o uso de produtos naturais de origem vegetal, animal e mineral são a principal base da terapêutica. Alternativas como a utilização de plantas se tornou uma prática cada vez mais difundida em função do baixo custo e fácil obtenção. Porém, devido a falta de comprovação científica o tratamento pode tornar-se prejudicial ao paciente devido ao uso inadequado de determinadas espécies vegetais.

A Organização Mundial da Saúde incentiva a utilização de plantas medicinais para o tratamento de várias enfermidades, inclusive o diabetes, doença que atinge cerca de 151 milhões de pessoas no mundo, especialmente em países onde o acesso aos tratamentos convencionais não são adequados (WHO, 1980; ABDEL-BARRY et al., 1997). Hoje no Brasil são mais de 5 milhões de diabéticos, sendo 90% diabéticos do tipo II. O tratamento dessa desordem financiado pelo governo, não atinge de forma satisfatória a população alvo devido ao custo de manutenção desse tipo de programa. O alto custo do tratamento também prejudica a continuidade adequada para os pacientes de forma individualizada. Desta forma, o estudo de compostos naturais com ações que mimetizem ou potencializem as ações da insulina tornou-se um campo de importância estratégica no desenvolvimento de novos fármacos.

A *Bauhinia forficata* Link é uma destas plantas, conhecida popularmente como hipoglicemiante. Resultados anteriores deste laboratório os quais deram

origem a duas dissertações de mestrado, mostraram que a fração *n*-butanol, rica em flavonóides glicosilados, teve efeito hipoglicemiante após tratamento agudo em ratos diabéticos sem alterar a curva de tolerância à glicose (SILVA et al., 2002). Desta fração foram isolados, purificados e identificados três canferóis, entre eles, o majoritário, canferitrim (PIZZOLATTI et al., 2003). A curva de dose-resposta deste composto mostrou um efeito hipoglicemiante significativamente melhor do que o observado para a fração *n*-butanol e reduziu a glicemia em ratos diabéticos em todos os tempos e doses estudados. Também, com doses semelhantes às aquelas estudadas *in vivo*, exibiu um efeito anti-oxidante *in vitro* por mostrar alta reatividade com o 1,1-difenil-2-picril hidrazil, inibiu a atividade da mieloperoxidase, diminuiu a peroxidação lipídica induzida pelo radical ascorbil tanto em microssomas de fígado de ratos como em lipossomas de fosfatidilcolina e asolecitina (DE SOUSA et al., 2004). O estudo deste composto em ratos normoglicêmicos e diabéticos revelou uma ação significativa na captação de glicose no músculo sóleo, não influenciou a síntese protéica *in vitro* e não interferiu na glicosúria após tratamento por via oral. Estes resultados mostraram um efeito agudo do canferitrim percentualmente tão eficaz quanto a insulina embora utilizado em doses mais altas do que o hormônio purificado (JORGE et al., 2004). Estes fatos, ao nosso ver, justificaram o desenvolvimento dos objetivos descritos a seguir.

### 3 OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

Estudar a relação estrutura-atividade de flavonóides e de complexos de vanádio na glicemia de ratos diabéticos quimicamente induzidos, bem como identificar as vias de melhor atuação dos compostos e complexos e comparar estes resultados com a conhecida ação hipoglicemiante da insulina e do vanádio.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a curva de tolerância à glicose oral bem como o efeito da insulina exógena pela via intraperitoneal.
- Determinar o efeito do canferol e da quercetina (proveniente das folhas da *B. forficata*) na glicemia de ratos diabéticos após um período agudo de tratamento (0, 1, 2 e 3 horas) por via oral.
- Determinar o efeito do canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo proveniente das folhas da *B. forficata* nos períodos de 0, 1, 2, 3, 6 e 24 horas após o tratamento por via intraperitoneal na glicemia de ratos diabéticos.

- Determinar o efeito do canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo isolado do caule fresco de *Cyathea phalerata* em um período agudo (0, 1, 2 e 3 horas) por via oral e nos períodos de 0, 1, 2, 3, 6 e 24 horas por via intraperitoneal em ratos diabéticos.
- Determinar os equilíbrios químicos dos flavonóides canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (*B. forficata*) e canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*C. phalerata*).
- Estudar os equilíbrios de complexação dos flavonóides canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (*B. forficata*) e canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*C. phalerata*) com o íon vanádio (IV).
- Estudar as atividades dos complexos de canferol com vanádio (IV), canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) (*B. forficata*) e canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO(IV) (*C. phalerata*) na glicemia de animais diabéticos por via oral e intraperitoneal em períodos de 0, 1, 2, 3, 6 e 24 horas.
- Comparar o efeito hipoglicemiante dos compostos livres canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (*B. forficata*) e canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*C. phalerata*) com a insulina (0,5 UI) após um período longo de tratamento.
- Comparar a biopotência dos complexos de vanádio, canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) (*B. forficata*) e canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO(IV) (*C. phalerata*) com o íon vanádio e com a insulina na glicemia de ratos diabéticos.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1.1 Reagentes

Glicose PAP – Kit utilizado para dosagem da glicemia pelo método enzimático da glicose oxidase da Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Aloxana - Monohidrato de aloxana; Sulfato de vanádio foram obtidos da Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA.

Insulina - Insulina humana regular (R) – Biohulin, doação da Biobrás Bioquímica do Brasil, Águas Claras, MG, Brasil.

Ácido clorídrico; Biftalato ácido de potássio- utilizado para a padronização das soluções de KOH 0,100 mol/L; Ácido acético glacial e ácido ascórbico- usados na padronização da solução de sulfato de vanadila.– obtidos da VETEC Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Hidróxido de potássio – ampolas diluídas obtidos da J.T. Baker, Deventer, Holanda.

Cloreto de potássio- utilizado para manutenção da força iônica; EDTA dissódico- utilizado para padronização de soluções de manganês; Sulfato de

manganês- utilizado para a padronização da solução de sulfato de vanadila obtidos da SIGMA Chemical Company, St Louis, Missouri, EUA.

Todos os outros reagentes P.A. de uso de rotina foram adquiridos da Merck do Brasil, Diadema, SP, Brasil.

#### **4.1.2 Soluções**

Aloxana - Monohidrato de aloxana, 98%, utilizada na concentração de 50 mg/kg de peso corporal em solução fisiológica ( NaCl 0,9%).

Solução de etanol/água 70:30 – preparada a partir de etanol absoluto e água bidestilada e fervida.

Solução estoque de sulfato de vanádio (  $\text{VOSO}_4$  ) 0,0607 mol/L – preparada a partir do sal  $\text{VOSO}_4$  .

Solução de KOH etanólico padrão 0,100 mol/L isenta de  $\text{CO}_2$  – a partir de ampolas diluit-it (Baker).

Solução de biftalato ácido de potássio (KHP) – preparada a partir do sal, imediatamente antes do uso.

Solução de ácido clorídrico etanólico 0,010 mol/L – solução estoque .

Solução de EDTA dissódico 0,01 mol/L – solução estoque.

Solução de sulfato de manganês 0,0099 mol/L – solução estoque.

### 4.1.3 Equipamentos Utilizados

Balança eletrônica (Sartori) - Utilizada para pesagem de reagentes e compostos.

Balança eletrônica Urano ( modelo UD 6000/1 – L) – utilizada para pesagem dos animais.

Banho metabólico com agitação (Quimis) - Aparelho termostatizado com atmosfera úmida.

Espectrofotômetro UV / Visível (Pharmacia LKB-Ultrospec III) - Utilizado para leitura das dosagens de glicose.

Centrífuga baby Fanem – para separação do soro das amostras de sangue coletadas.

Célula termostatizada com banho termostatizado de fabricação Microquímica- para a titulação potenciométrica dos flavonóides.

Agitador magnético – para manutenção da agitação durante as titulações.

pHmetro da marca CORNING, modelo 350 – para medida dos valores de pH no decorrer da titulação potenciométrica.

Bureta semi-automática– para a adição do titulante.

#### **4.1.4 Obtenção de Compostos Naturais da Espécie *Bauhinia forficata* Link**

##### **4.1.4.1 Coleta e identificação**

As folhas da espécie vegetal *Bauhinia forficata* foram coletadas em novembro de 1998 na cidade de Orleans no sul do estado de Santa Catarina. A planta foi identificada pelo Professor Daniel de Barcellos Falkenberg do Departamento de Botânica da UFSC, onde uma exsicata da espécie foi depositada sob o número FLOR-31271.

##### **4.1.4.2 Preparação do extrato bruto e frações**

As folhas (960 g) foram secas em estufa de ar a 30 °C, trituradas e extraídas separadamente por maceração exaustiva com EtOH/H<sub>2</sub>O (8:2) à temperatura ambiente em dois ciclos de 14 dias. O extrato hidroalcólico foi evaporado à vacuo a 50 °C até  $\frac{1}{5}$  do volume inicial e mantido em repouso por dois dias a 4 °C. Em seguida, esta solução foi filtrada em papel filtro e o filtrado aquoso submetido a um particionamento sucessivo com *n*-hexano, AcOEt, e *n*-butanol. O solvente de cada fase orgânica foi evaporado para a obtenção das respectivas frações hexano, acetato de etila e *n*-butanol (Fluxograma 1).

##### **4.1.4.3 Isolamento dos flavonóides das folhas**

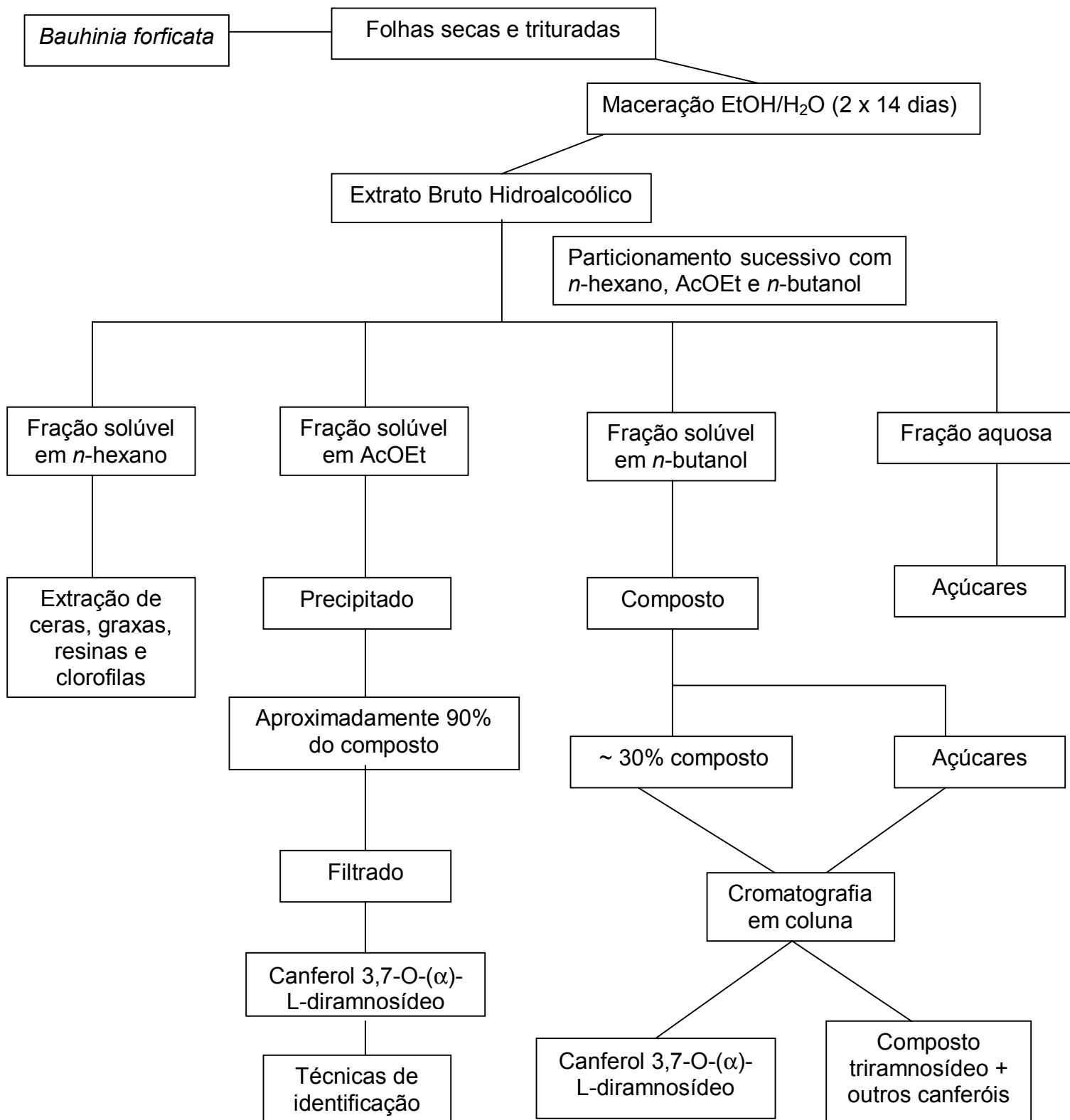
Conforme descrito por Pizzolatti et al. (2003) com algumas modificações, as frações AcOEt e *n*-BuOH das folhas foram submetidas ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) de sílica gel e posteriormente analisadas em cromatografia de camada delgada (CCD). Nesta análise foram encontrados 5 compostos: o canferol, canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo, canferol 3-O- $\beta$ -D-

glicopiranosil-(1→6)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, quercetina 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e quercetina 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1→6)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo.

#### 4.1.4.4 Caracterização dos compostos

Os compostos isolados foram identificados através de técnicas de espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectroscopia de massas (Pizzolatti et al., 2003). O fluxograma 1 representa esquematicamente os procedimentos experimentais para a obtenção dos compostos flavonoídicos a partir das folhas de *B. forficata*.

Vale a pena ressaltar que os procedimentos de coleta, fracionamento e caracterização dos compostos utilizados nesta dissertação estiveram sob a responsabilidade e coordenação do Prof Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, não havendo participação direta da mestranda nesta etapa. Por outro lado, entendemos que o esclarecimento da origem e obtenção dos compostos facilitam a interpretação dos resultados.



Fluxograma 1. Representação esquemática do fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Bauhinia forficata*.

#### 4.1.5 Compostos Majoritários Isolados das Folhas da *Bauhinia forficata*

Composto: canferol

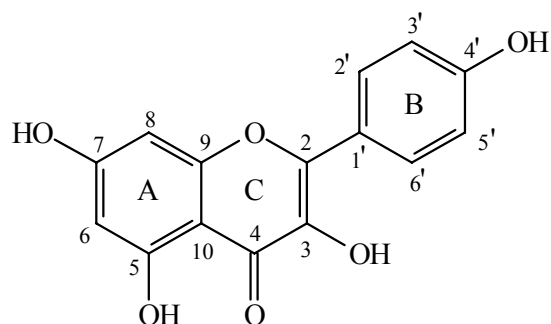
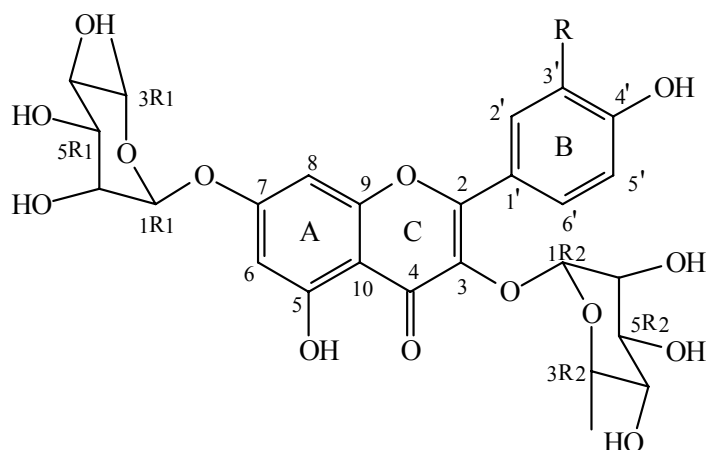


Figura 9. Estrutura química do composto canferol.

Composto: canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (R=H); quercetina 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (R=OH).



R=H

R=OH

Figura 10. Estrutura química dos compostos canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e quercetina 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo.

Composto: canferol 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (R=H) e quercetina 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (R=OH).

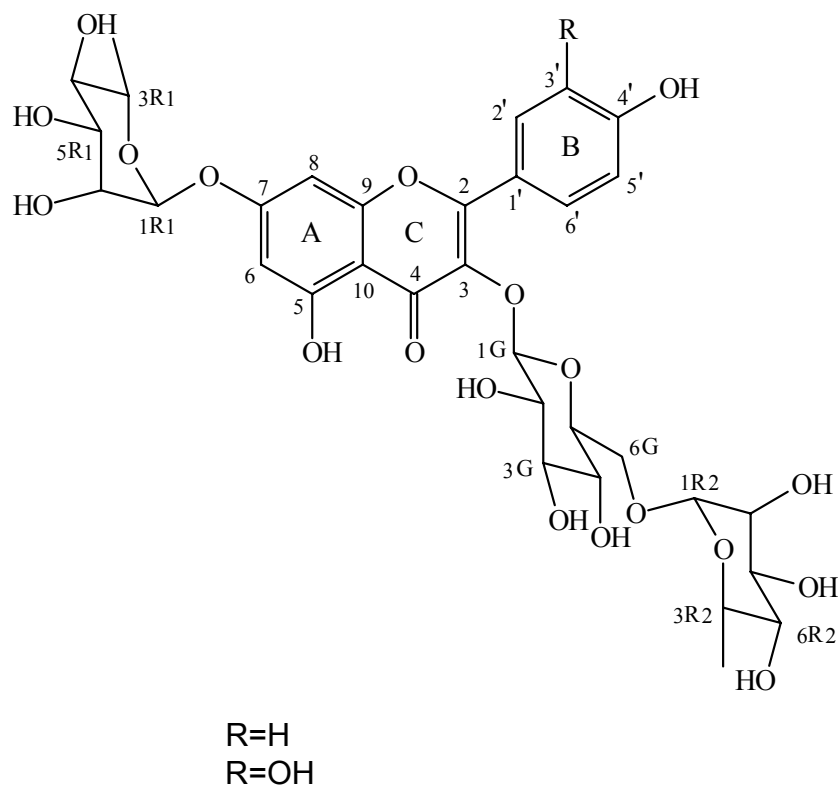


Figura 11. Estrutura química dos compostos canferol 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo e quercetina 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo.



#### **4.1.6 Obtenção de Compostos Naturais da Espécie *Cyathea phalerata***

##### **4.1.6.1 Coleta e identificação**

Os caules da espécie vegetal *Cyathea phalerata* foram coletados em abril de 2002 na localidade de Alto Aririú, município de Palhoça no estado de Santa Catarina. A planta foi identificada pela Professora Lana Silvestre do Departamento de Botânica da UFRJ, onde uma exsicata da espécie foi depositada sob o número RBR-4287.

##### **4.1.6.2 Preparação do extrato bruto e frações**

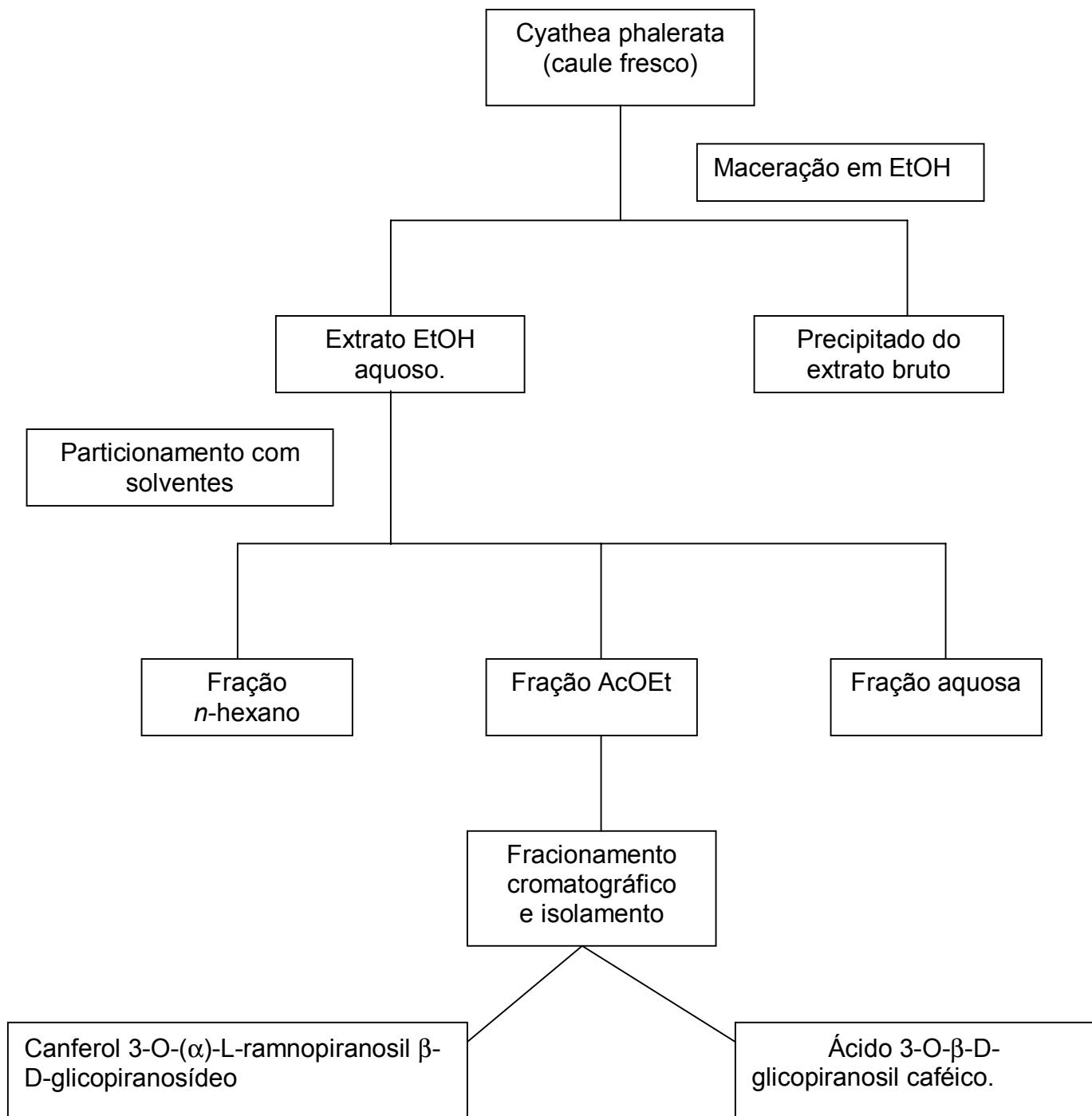
O extrato etanólico foi obtido a partir do caule fresco por maceração exaustiva com EtOH à temperatura ambiente. Este extrato foi submetido a um particionamento líquido-líquido com *n*-hexano e AcOEt. O solvente de cada fase orgânica foi evaporado para a obtenção das respectivas frações *n*-hexano e AcOEt.

##### **4.1.6.3 Isolamento dos flavonóides**

A fração AcOEt foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, utilizando como eluente misturas de hexano-acetato de etila e etanol com gradiente de polaridade crescente. As frações recolhidas foram analisadas em CCD, seguido de purificação por recristalização. Após esta análise foram encontrados 2 compostos: canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo e ácido 4-O- $\beta$ -D-glicopiranosil caféico.

#### 4.1.6.4 Caracterização dos compostos

Os compostos isolados foram identificados com base nos dados espectroscópicos de infravermelho, massa, ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , APT e HETCOR e por comparação com dados da literatura. O fluxograma 2 representa esquematicamente os procedimentos experimentais para a obtenção dos compostos a partir do caule de *Cyathea phalerata*.



Fluxograma 2. Representação esquemática do fracionamento do extrato bruto etanólico do caule fresco de *Cyathea phalerata*.

#### 4.1.7 Compostos Majoritários Isolados do Caule Fresco da *Cyathea phalerata*

Composto: canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo.

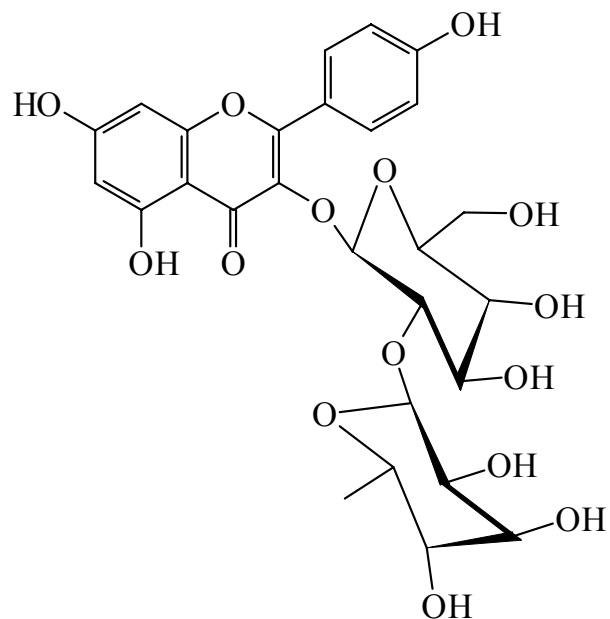


Figura 12. Estrutura química do composto canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo.

Composto: ácido 4-O- $\beta$ -D-glicopiranosil caféico.

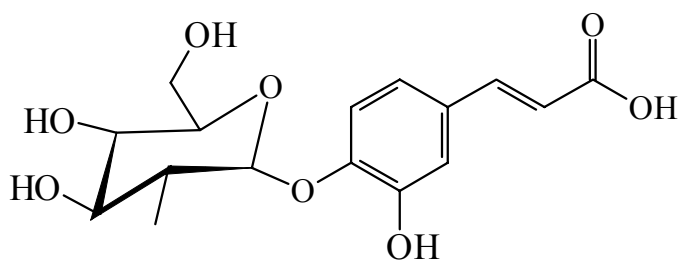


Figura 13. Estrutura química do composto ácido 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil caféico.

#### 4.1.8 Estudo dos Equilíbrios Químicos do Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) e Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-Ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo - VO(IV)

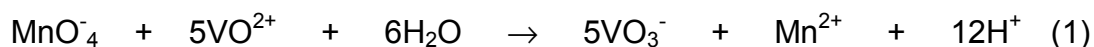
##### 4.1.8.1 Ligantes

O ligante canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo foi isolado da fração *n*-butanol das folhas da *Bauhinia forficata* conforme descrito por Pizzolatti et al. 2003. O ligante canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi obtido a partir do extrato etanólico de *Cyathea phalerata*.

##### 4.1.8.2 Reagentes

O sulfato de vanádio ( $\text{VOSO}_4$ ), o cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e o cloreto de potássio (KCl) de grau analítico P.A. foram utilizados sem prévia purificação. As soluções de hidróxido de potássio (KOH) 0,100 mol/L isentas de carbonatos ( $\text{CO}_2$ ) foram preparadas a partir de ampolas Diluit-it e padronizadas através de titulações com biftalato ácido de potássio (KHP), usando fenolftaleína como indicador.

A solução estoque de  $\text{VO}^{2+}$  foi preparada pesando-se quantidades equimolares de  $\text{VOSO}_4$  e  $\text{BaCl}_2$  e diluindo-se em água previamente bidestilada e fervida a 80 °C (para evitar a presença de  $\text{CO}_2$  dissolvido) até completa precipitação de sulfato de bário ( $\text{BaSO}_4$ , sólido branco). Após, o precipitado de  $\text{BaSO}_4$  foi removido por filtração. A concentração exata do metal em solução foi determinada através da titulação da mesma com solução padrão de permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) através do método que utiliza a reação de óxido-redução (FURNAN, 1962) (Esquema 1):



#### Esquema (1)

Foi preparada uma solução estoque de etanol e água bidestilada e fervida 70/30 %, v/v, em presença de KCl 0,100 mol/L (força iônica). Ácido clorídrico  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L foi adicionado a solução etanólica e titulado com KOH padrão, livre de  $\text{CO}_2$ . Esta titulação foi utilizada para determinar o  $\text{pK}_w$  da solução e ser utilizada como padrão de calibração dos eletrodos e do pHmetro, com o objetivo de ler diretamente  $-\log[\text{H}^+]$  ou seja pH.

#### 4.1.8.3 Solventes

Devido à baixa solubilidade do ligante em meio aquoso, os experimentos foram realizados em meio etanólico (EtOH/ $\text{H}_2\text{O}$  70:30 v/v), mantendo força iônica constante em 0,100 mol/L (KCl). O etanol P.A. foi utilizado como recebido.

#### 4.1.8.4 Medidas de equilíbrio potenciométrico

A titulação potenciométrica dos ligantes canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi realizada em uma célula termostatizada e selada, com capacidade de 50 mL, mantendo a temperatura constante em  $25,00 \pm 0,05$  °C em banho termostatizado com água circulante em um sistema fechado. A atmosfera foi mantida inerte por um fluxo contínuo de argônio, fornecido pela White Martins e purificado pela passagem do fluxo de gás através de uma solução de pirogalol em KOH etanólico. Durante a titulação, as soluções experimentais foram mantidas sob constante agitação pelo uso de um agitador magnético (Figura 14).

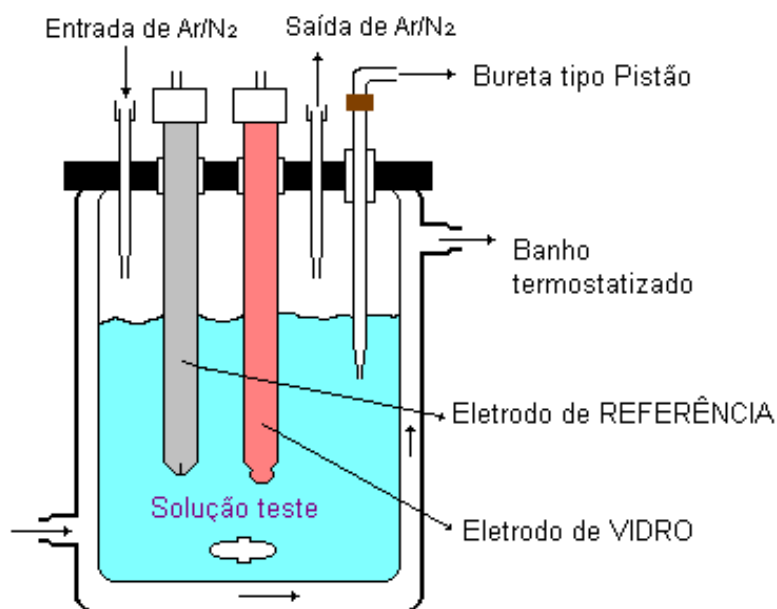


Figura 14. Sistema utilizado na titulação potenciométrica.

O sistema de medida de pH foi composto de um eletrodo de referência tipo Ag/AgCl e um eletrodo de vidro, ambos da marca Ingold, conectados a um pHmetro da marca CORNING, modelo 350. O titulante foi adicionado em alíquotas de 0,05 mL a partir de uma bureta automática tipo pistão de 20 mL de capacidade da marca SCHOTT GERATE. A inclinação da resposta do pHmetro foi ajustada através de titulações de soluções etanólicas (EtOH/H<sub>2</sub>O 70:30 v/v) padrões de HCl 0,010 mol/L com KOH etanólico (EtOH/H<sub>2</sub>O 70:30 v/v) padrão 0,100 mol/L, livre de CO<sub>2</sub>. Antes de cada titulação potenciométrica, o sistema (pHmetro + eletrodos) foi calibrado e ajustado com a solução etanólica de HCl, diluído e de pH conhecido, para obter a leitura direta de  $-\log [H^+]$ , durante a titulação, e a força iônica foi mantida constante em 0,100 mol/L com a adição de KCl.

As medidas de equilíbrio foram realizadas em soluções contendo 0,05478 mmols de canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e 0,0503 mmols de canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo. O sistema metálico contendo canferol-3,7-

O-( $\alpha$ )-diramnosídeo e VO(IV) na relação 2:1 foi estudado com 0,0549 mmols de canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo e 0,0261 mmols de VO(IV), enquanto o sistema canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo e VO(IV), relação 1:1(ligante:íon metálico) foi avaliado com 0,0503 mmols de ambos os componentes. Cada sistema foi titulado no mínimo três vezes.

O pKw da água em presença de etanol (EtOH/H<sub>2</sub>O 70:30 v/v), acidificada com HCl de concentração conhecida, foi determinado por titulação potenciométrica pela adição de alíquotas de KOH etanólico padrão. O valor obtido de 14,76 é comparável ao valor da literatura para um sistema EtOH 25 % + H<sub>2</sub>O 75 % descrito em torno de 14,78 (CLARKE; MARTELL, 1991).

#### **4.1.8.5 Computação**

Os cálculos das constantes de protonação e das constantes de complexação foram determinados com a ajuda do programa computacional BEST7 e as curvas de distribuição das espécies foram obtidas com o auxílio dos programas SPE e SPEPLOT (MARTELL; MOTEIKAITIS, 1992).

#### **4.1.9 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos entre 50-55 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e alimentados com ração comercial e água *ad libitum* em sala climatizada onde eram submetidos a um ciclo normal de claro/escuro (luzes acesas das 6 às 19 h). Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho Brasileiro de Medicina Veterinária e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, protocolo 142/CEUA/UFSC.



#### 4.1.10 Modelo de Diabetes Experimental

O uso do diabetes experimental na pesquisa tem a vantagem de permitir a análise dos eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante a indução ao estado diabético, após o mesmo ter se instalado, durante a evolução à deficiência severa de insulina ou até mesmo à morte do animal (ISLAS-ANDRADE et al., 2000).

Há várias técnicas para a indução do diabetes experimental, as quais incluem: destruição química das células  $\beta$  pancreáticas, remoção cirúrgica da massa de células  $\beta$  ou a pancreatectomia, injúria ao hipotálamo ventromedial, dietas ricas em açúcares, gorduras, má nutrição *in utero* ou altas doses de hormônios contra-regulatórios como os glicocorticóides (ISLAS-ANDRADE et al., 2000).

O estado diabético pode ser induzido quimicamente através da administração de fármacos. Entre os mais utilizados estão a 2,4,5,6-tetraoxohexahidropirimidina, aloxana e a 2-deóxi-2-(3-metil-3-nitrosoureído)-D-glicopirranose, estreptozotocina (FISCHER, 1985; ISLAS-ANDRADE et al., 2000; VERSPOHL, 2002). A utilização destes compostos, proporciona alterações na morfologia e função das células secretoras de insulina, subseqüentemente, permitindo a perda do controle hormonal sobre o metabolismo de carboidratos (FISCHER, 1985).

O diabetes foi induzido através de uma única injeção intravenosa de monohidrato de aloxana (Sigma) 5% em solução fisiológica (NaCl 0,9%) na dose de 50 mg/kg de peso corporal na veia dorsal do pênis de animais, sob anestesia etérea. Esta solução foi sempre preparada imediatamente antes do uso. Três dias depois foram coletadas as amostras de sangue pela veia do plexo retro-orbital e os níveis de glicose foram determinados para confirmar o desenvolvimento do diabetes. Foram considerados diabéticos apenas os animais que apresentavam

glicose entre 350-460 mg/dL de glicose. A figura 15 mostra o procedimento utilizado para a indução do diabetes experimental neste trabalho.



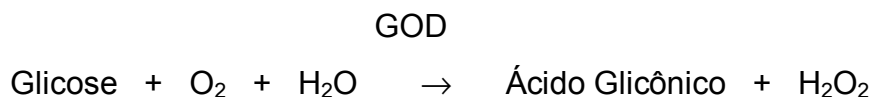
Figura 15. Indução do diabetes através da injeção intravenosa de aloxana na veia dorsal peniana.

#### **4.1.11 Coleta do Sangue e Determinação da Glicemia**

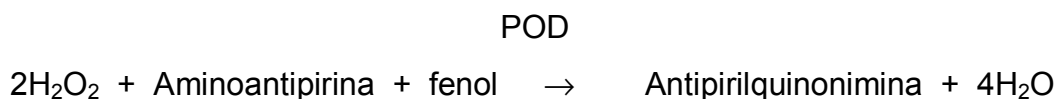
Todos os animais estavam em jejum de aproximadamente 16 horas antes da coleta de sangue. O sangue foi coletado por capilaridade pelo plexo retro-orbital em tubos de eppendorf. Após centrifugadas, alíquotas de 10  $\mu$ L de soro (em duplicatas) foram utilizados para dosar a glicose pelo método enzimático da glicose oxidase (GLICOSE PAP da LABTEST). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 37 °C e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro em 505 nm. Todas as dosagens glicêmicas foram feitas dentro de uma hora após a coleta. Os resultados foram expressos em mg/dL de glicose.

Princípio do método segundo descrito por VARLEY et al (1976)

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento que forma uma antipiriquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.



$$\text{Através da fórmula Glicose} = \frac{\text{Absorbância}_{\text{teste}}}{\text{Absorbância}_{\text{padrão}}} \times 100,$$

O resultado da dosagem foi expresso em mg/dL.

## 4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Para todos os ensaios biológicos os animais foram mantidos em jejum de 16 horas antes do início dos experimentos. Os animais foram divididos em grupos de cinco, controles e tratados. A glicemia foi dosada nos períodos especificados para cada grupo.

## **4.2.1 Tratamentos Utilizando a Via Intraperitoneal**

### **4.2.1.1 Efeito da insulina 0,1 e 0,5 UI em ratos normais hiperglicêmicos**

Os animais foram divididos em diferentes grupos. Grupo I, controle, animais normoglicêmicos, não tratado; Grupo II controle hiperglicêmico, receberam glicose (4 g/kg de peso corporal); Grupo III (tratado), receberam glicose (4 g/kg) e insulina na dose de 0,1 ou 0,5 UI. Amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após o tratamento (fluxograma 3).

### **4.2.1.2 Efeito da insulina 0,5 UI em ratos diabéticos induzidos com aloxana 50 mg/kg**

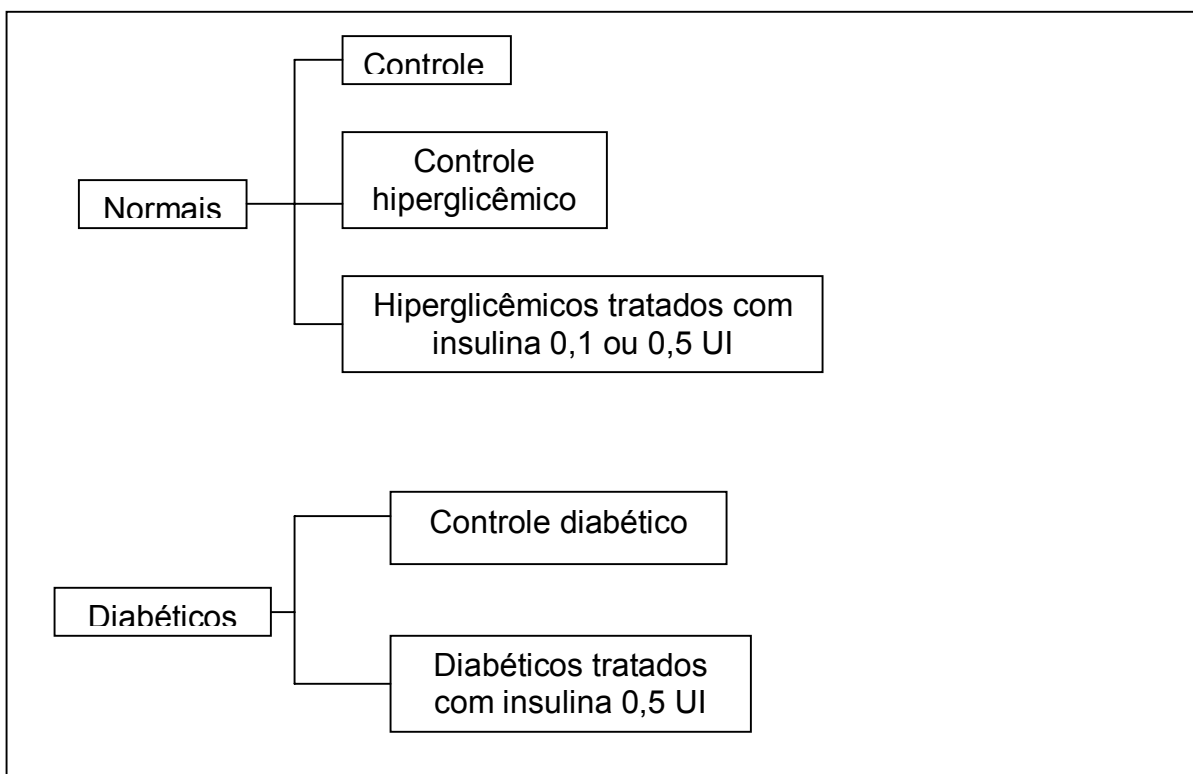
Ratos diabéticos foram divididos em: Grupo I, controle diabético, não tratado; Grupo II, diabético, receberam insulina na dose de 0,5 UI. A glicemia foi determinada no tempo 0, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após o tratamento (fluxograma 3).

### **4.2.1.3 Efeito do vanádio(IV) na glicemia de animais diabéticos**

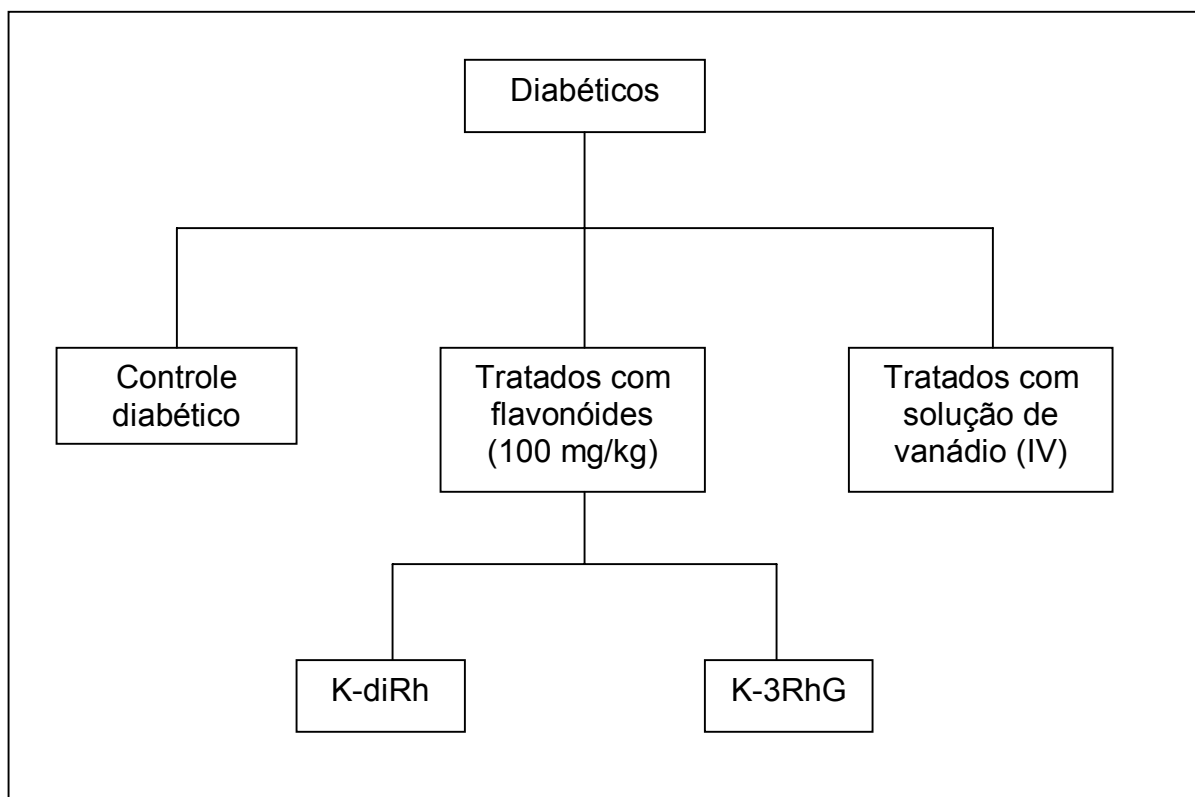
Ratos diabéticos foram tratados pela via oral ou intraperitoneal com vanádio (IV) Grupo I, diabéticos que receberam vanádio (IV) na dose de 0,0146 mmol (0,0607 mol/L mesma utilizada na preparação do complexo). Os níveis de glicose no plasma foram verificados nos tempos 0, 1, 2, 3, 6 e 24 horas após o tratamento (fluxograma 4).

#### 4.2.1.4 Efeito dos flavonóides canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo e canferol-3,7-o-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo na glicemia em ratos diabéticos

Ratos diabéticos foram divididos em diferentes grupos de cinco animais cada. Grupo I, controle diabético; Grupo II diabéticos que receberam por via intraperitoneal um dos compostos canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*C. phalerata*) ou canferol-3,7-o-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (*B. forficata*) na dose de 100 mg/kg. Os níveis de glicose no plasma foram verificados nos tempos 0, 1, 2, 3, 6 e 24 horas após o tratamento (fluxograma 4).



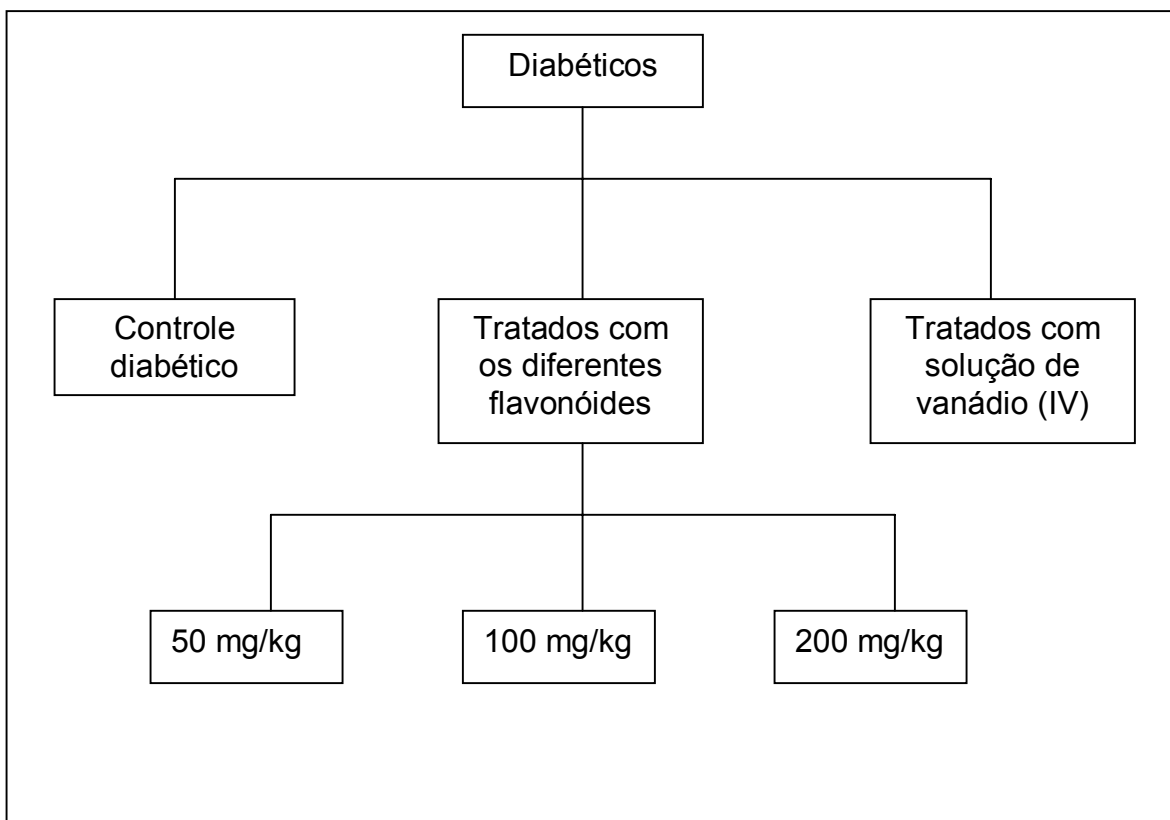
Fluxograma 3. Representação esquemática dos ensaios para avaliação do efeito da insulina nas doses de 0,1 e 0,5 UI em animais normais hiperglicêmicos e diabéticos.



Fluxograma 4. Representação esquemática para avaliação do efeito dos flavonóides canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*C. phalerata*) e canferol-3,7-o-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (*B. forficata*) na dose de 100 mg/kg e do vanádio (IV) administrados por via intraperitoneal.

#### 4.2.2 Tratamentos com Diferentes Compostos Naturais por Gavagem pela Via Oral

Ratos diabéticos foram divididos em diferentes grupos. Grupo I, controle diabético; Grupo II a, b, c, tratados, receberam um dos compostos canferol (nas doses 50, 100 e 200 mg/kg), canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (nas doses 50, 100 e 200 mg/kg), quercetina (100 mg/kg) por via oral. Os níveis de glicose no plasma foram verificados nos tempos 0, 1, 2 e 3 h após o tratamento (fluxograma 5).



Fluxograma 5. Representação esquemática dos tratamentos com diferentes compostos naturais administrados por via oral.

#### 4.2.3 Tratamentos com os Complexos (Flavonóide + Vanádio) pelas Vias Oral e Intraperitoneal

##### 4.2.3.1 Efeito do complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 na glicemia de ratos diabéticos

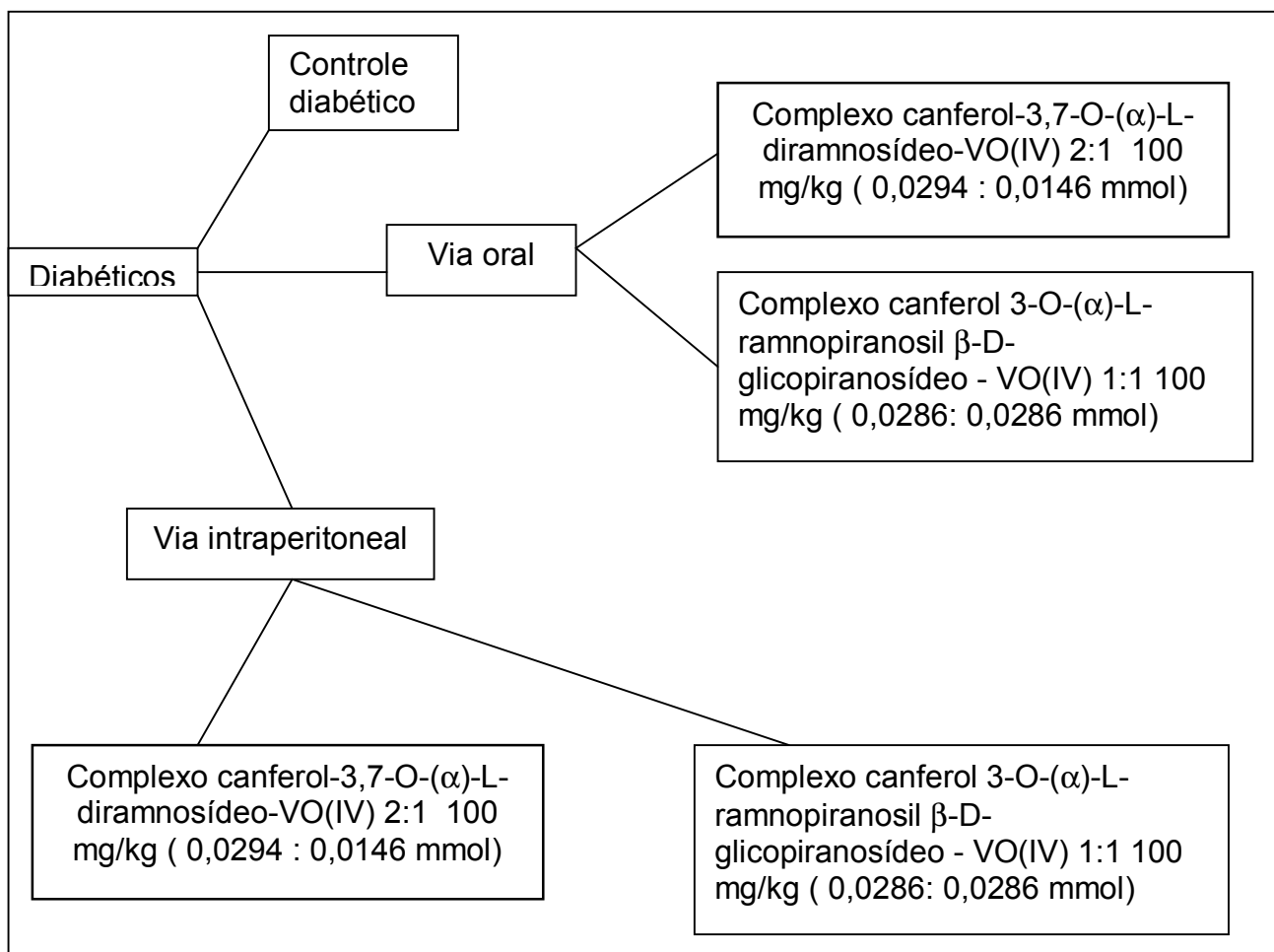
Ratos diabéticos foram divididos em diferentes grupos controles e tratados. Grupo I, controle diabético, não tratado; Grupo II, diabéticos tratados com o complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 100 mg/kg por **via oral**

(0,0294 : 0,0146 mmol); Grupo III diabéticos tratados com o complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 por **via intraperitoneal**; Os níveis de glicose no plasma foram verificados nos tempos 0, 1, 2 , 3, 6 e 24 horas após o tratamento (fluxograma 6).

#### **4.2.3.2 Efeito do complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo - VO(IV) 1:1 na glicemia de ratos diabéticos**

Ratos diabéticos foram divididos em diferentes grupos controles e tratados. Grupo I, controle diabético, não tratado; Grupo II, diabéticos tratados com o complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo - VO(IV) 1:1, 100 mg/kg por **via oral** ( 0,0286: 0,0286 mmol); Grupo III, diabéticos tratados com o complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo - VO(IV) 1:1 por **via intraperitoneal**. Os níveis de glicose no plasma foram verificados nos tempos 0, 1, 2 , 3, 6 e 24 horas após o tratamento (fluxograma 6).





Fluxograma 6. Representação esquemática dos tratamentos com os complexos (flavonóide + vanádio) pelas vias oral e intraperitoneal.

#### 4.3 DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M., conforme número de amostras. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT versão 2.02. As comparações entre dois grupos foram feitas através do teste "t" de Student. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um p igual ou menor que 0,05.

#### 4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE FÍGADO DE RATOS TRATADOS COM VANÁDIO

Ratas entre o 8° e 10° dia de gestação foram tratadas com vanadato (0,1 mmol/L) na água de beber por 4 semanas. O tecido hepático de ratos de 15 dias de idade controles e tratados *in vivo* com vanadato foi retirado, cortado em fatias de 5 µm de espessura e fixado em Boiün durante 24 h. A desidratação foi feita com série crescente de álcool e a inclusão foi em paraplast. Cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina (H.E.) e fotografados em microscópio Nikon. A análise histológica mostrou não haver diferença entre o tecido hepático dos animais controles e dos tratados com vanádio, neste período sub-crônico de tratamento (figura 16).

Oportunamente utilizamos ratos tratados com vanádio em concentrações próximas as que utilizamos para a preparação dos complexos para a análise morfológica do fígado (órgão de detoxificação) após o tratamento sub-crônico por 4 semanas. A idade foi escolhida em função da vulnerabilidade dos tecidos durante este período crítico do desenvolvimento.

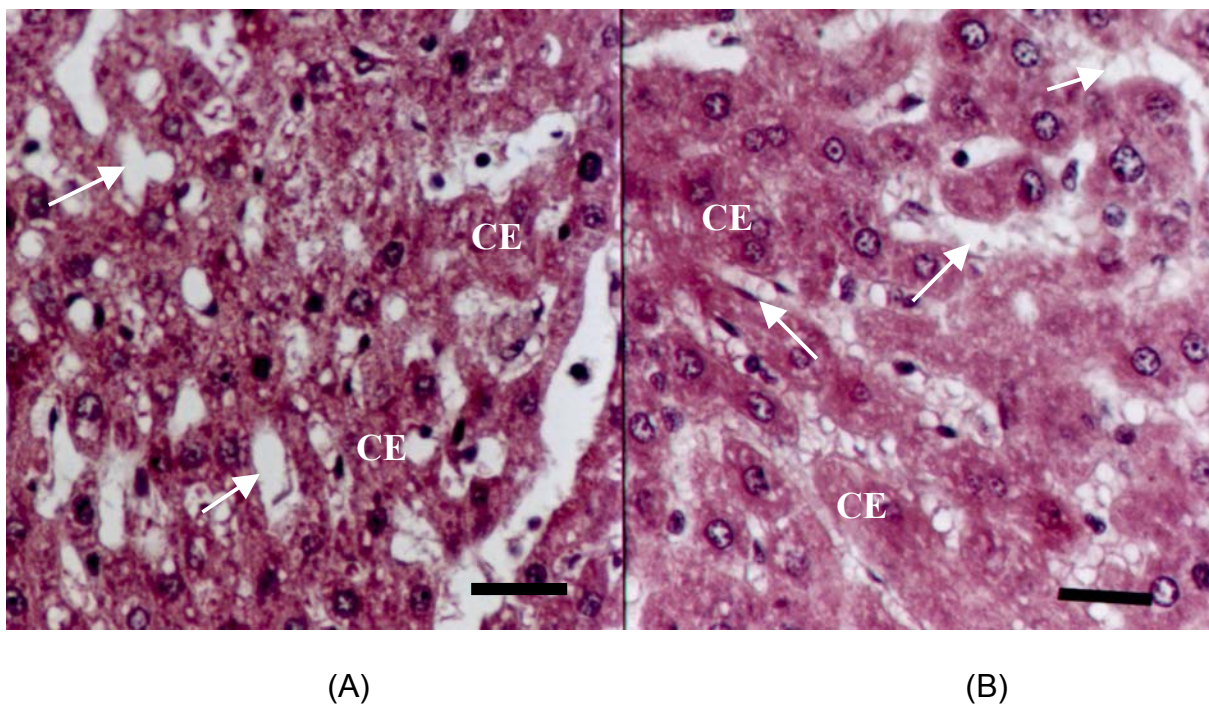


Figura 16: (A) Fígado controle; (B) Fígado tratado com vanadato. Cordões de hepatócitos anastomozados (CE); Capilares sinusóides (setas). Coloração H.E. Aumento: 100X. Escala: 100  $\mu$ m.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Parte I*

#### 5.1 Caracterização do Modelo Experimental do Diabetes Melito Tipo I Induzido por Aloxana

Aloxana é uma substância que provoca a destruição específica das células  $\beta$  do pâncreas, levando ao estado de deficiência de insulina. Os níveis de glicemia obtidos nos animais são bastante variados. Essa variação pode ocorrer em função das doses administradas, bem como em função da idade do animal ou ainda da raça, sexo e estado nutricional (FISCHER, 1985; ISLAS-ANDRADE et al., 2000; VERSPOHL, 2002).

Em estudo anterior realizado por Jorge (2003) em nosso laboratório, foram avaliadas diferentes doses de aloxana a fim de determinar o melhor perfil do diabético do tipo I segundo parâmetros glicêmicos. Foram administradas pela via intravenosa doses de 50, 60 ou 70 mg/kg de peso corporal em uma única administração conforme descrito na seção materiais e métodos. Com a dose de 50 mg/kg obteve-se uma glicemia na faixa de 350-480 mg/dL, para a dose de 60 mg/kg a glicemia variou entre 490-580 mg/dL enquanto com a dose de 70 mg/kg os valores apresentaram-se ainda maiores, 620-950 mg/dL, caracterizando um diabetes severo (JORGE, 2003).

A partir destes resultados e levando em consideração o estado fisiológico geral dos animais optou-se por trabalhar com a dose de 50 mg/kg de peso

corporal, que caracteriza um modelo diabético experimental com glicemia moderada.

A tabela 2 mostra uma redução significativa do peso corporal acompanhada de um aumento na glicemia dos animais quando comparado ao controle após o terceiro dia de indução do diabetes.

Tabela 2. Efeito da aloxana na dose de 50 mg/kg no peso corporal e na glicemia após o terceiro dia de indução do diabetes.

GRUPO	NORMOGLICÊMICOS	DIABÉTICOS
Peso Corporal (g)	210,7 ± 6,2 (54)	172,3 ± 5,6* (70)
Glicemia (mg/dL)	128,5 ± 2,7 (19)	435,9 ± 6,7* (30)

Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas. Os números entre parênteses significam o número de amostras utilizadas para o cálculo da média. \* significativo para  $p \leq 0,05$ .

## 5.2 Efeito Agudo da Administração de Insulina por Via Intraperitoneal na Curva de Tolerância à Glicose

A insulina é o principal hormônio responsável pela regulação do metabolismo de carboidratos no organismo. É sintetizada e armazenada nas células  $\beta$  do pâncreas e a glicose é o principal secretagogo deste hormônio. A secreção é bifásica, com uma fase inicial rápida devido à liberação da insulina estocada e uma segunda fase mais lenta, após a síntese de novo hormônio (BEARDSALL et al., 2003).

Na curva de tolerância à glicose, o indivíduo recebe uma carga oral de glicose e as concentrações glicêmicas são determinadas dentro de um período de

2 horas. Em indivíduos normais, a glicemia é inicialmente aumentada, atinge um pico máximo e posteriormente volta ao normal.

Na figura 17, podemos observar que em animais normais hiperglicêmicos, após 30 minutos da administração oral de glicose (4 g/kg) a glicemia dobrou. Os níveis hiperglicêmicos foram mantidos significativamente altos até os 60 minutos em relação ao tempo zero e voltaram aos níveis basais aos 180 minutos. Este perfil caracterizou de maneira reproduzível a curva de tolerância à glicose neste modelo experimental.

Ainda na figura 17, a efetividade de ação da insulina exógena (Bioinsulin) administrada pela via intraperitoneal foi demonstrada utilizando-se duas diferentes doses. Tanto com a dose 0,1 como 0,5 UI a insulina impediu o pico da glicemia, característico neste modelo experimental, já aos 15 minutos após a administração do hormônio. Reduziu significativamente a glicemia dos 30 aos 180 minutos em relação ao respectivo tempo zero. Além disso, com ambas as doses a insulina manteve a glicemia significativamente abaixo dos níveis glicêmicos basais comparados ao grupo dos animais normoglicêmicos. Estes resultados além de traçarem um perfil do efeito imediato e efetivo máximo (41,9%) da ação da insulina neste modelo, também foram utilizados como padrão para a comparação dos efeitos hipoglicemiantes dos flavonóides complexados ou não e com o íon vanádio nos tratamentos pela via intraperitoneal.

Com relação a dose e o tempo de ação, estes resultados estão de acordo com os efeitos hipoglicemiantes clássicos já relatados para a insulina (GÖKE, 1998; HEI, 1998; NYSTROM; QUON, 1999; BEARDSALL et al., 2003). Também concordam com os descritos por Jorge et al. (2004) a respeito da ação da insulina sobre a captação de glicose em músculo sóleo de ratos. Aqueles resultados mostraram o efeito agudo do hormônio de maneira dependente da dose e significativo para 3,5 nmol/L (0,5 UI) e 7,0 nmol/L (1,0 UI) em relação à captação basal de glicose. A partir dos resultados da figura 17 optou-se por utilizar a dose

de 0,5 UI de insulina para a realização da curva de tolerância à glicose em animais diabéticos.

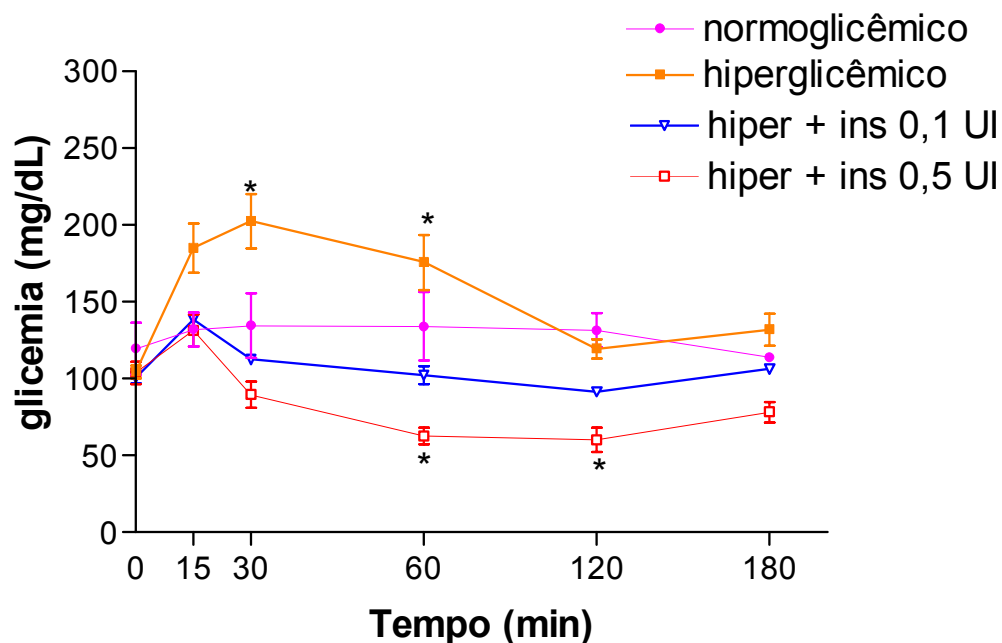


Figura 17. Efeito da administração de insulina 0,1UI e 0,5 UI via intraperitoneal na curva de tolerância à glicose (4 g/kg). Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n=5); \* significativo para  $p \leq 0,05$  em relação aos respectivos tempos zero.

Conforme mostrado na figura 18 foram estudados os efeitos da insulina na dose de 0,5 UI administrada por via intraperitoneal na curva de tolerância à glicose em animais diabéticos em jejum prévio de aproximadamente 16 horas. Os níveis de glicose foram medidos nos tempos zero, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos.

A figura 18 mostra que após a administração da insulina, os níveis de glicose em ratos diabéticos apresentaram uma redução contínua já a partir dos 15 minutos. Nos tempos 60, 120 e 180 minutos a atividade da insulina em relação ao tempo zero, foi de 16%, 54,6% e 67,5% respectivamente. Os níveis de glicose plasmática foram mantidos inferiores ao controle diabético em todos os tempos.

Comparando-se a atividade da insulina (0,5 UI) entre os animais diabéticos (figura 18) e os animais normais hiperglicêmicos tratados com o hormônio (hiper + insulina 0,5 UI; figura 17), observa-se que a hipoglicemia do grupo hiper+ insulina 0,5 UI da figura 17 foi mais rápida, ocorrendo já aos 60 minutos ( $\downarrow$  39,6%), 120 minutos ( $\downarrow$  41,9%) e aos 180 minutos ( $\downarrow$  24,6%).

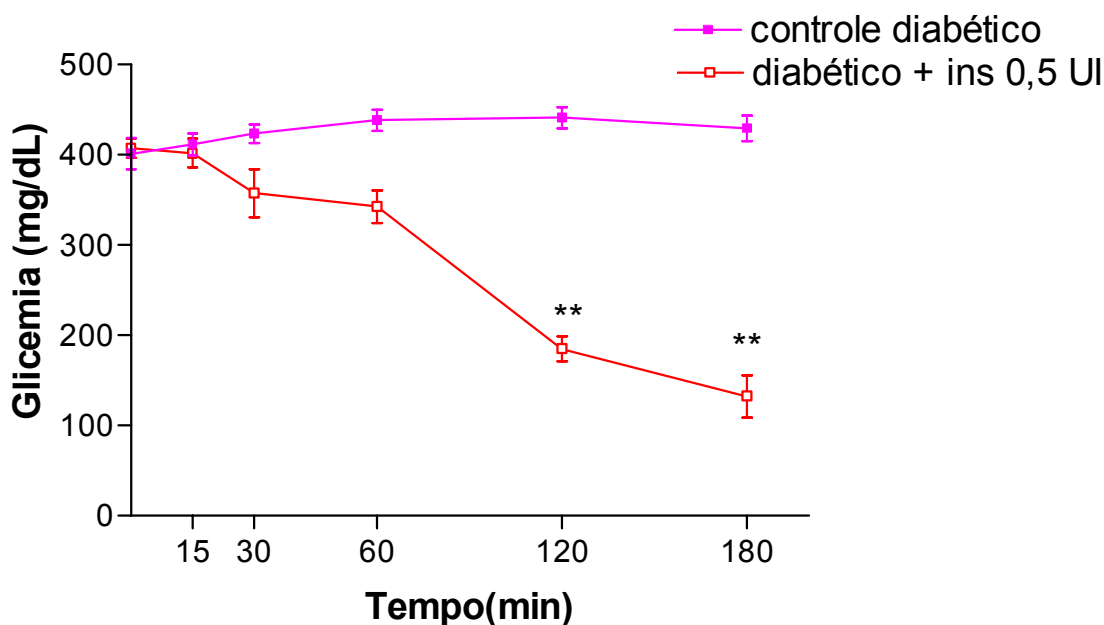


Figura 18. Efeito da administração de insulina 0,5 UI via intraperitoneal na glicemia em animais diabéticos. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n=5); \*\* significativo para  $p \leq 0,001$  em relação ao respectivo tempo zero.

No estado diabético, não há produção nem secreção do hormônio pelas células  $\beta$  pancreáticas, o que leva a uma hiperglicemia crônica. A administração de insulina exógena, difere da secreção fisiológica pois não ocorre a mimetização do perfil bifásico de elevação rápida e declínio normal da insulina em resposta ao alimento e também o hormônio difunde-se para a circulação periférica ao invés de ser liberado na circulação porta (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001; KASLAUSKAITE; FOGELFELD, 2003).



Considerando essas diferenças de secreção hormonal, a resposta hipoglicêmica do indivíduo diabético à insulina administrada exogenamente foi melhor observada que para os ratos normais sob condições hiperglicêmicas. Como pode ser observado na figura 18, a ação do hormônio foi contínua desde os 15 minutos e maior nos tempos de 120 e 180 minutos mesmo não havendo o perfil bifásico característico da condição fisiológica normal.

A efetividade desta resposta insulínica em animais que mimetizam o estado diabético é de extrema relevância neste trabalho uma vez que os efeitos hipoglicemiantes dos flavonóides que estudamos até o momento parecem atuar, preferencialmente, em tecidos alvos da insulina e não por induzir a secreção hormonal (SILVA et al., 2002; DE SOUSA et al., 2004; JORGE et al., 2004). Isto foi corroborado pelo fato de que, sem dúvida, a hipoglicemia foi observada sempre em animais diabéticos e foi insignificante quando estudados em animais normoglicêmicos. No entanto, cabe ressaltar que é de nosso interesse dosar os níveis de insulina residual em animais que foram induzidos o diabetes farmacologicamente.

### **5.3 Estudo da Relação Estrutura-Atividade de Flavonóides na Glicemia de Ratos Diabéticos**

#### **5.3.1 Provenientes das folhas da *B. forficata***

Os flavonóides constituem uma ampla classe de polifenóis de relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais (SIMÕES et al., 2001) e muitas das propriedades biológicas conhecidas estão relacionadas à estrutura química e habilidade de interagir com moléculas orgânicas (SAIJA et al., 1995). A estrutura química dos polifenóis determina a taxa e a extensão de absorção intestinal, além da natureza dos metabólitos circulantes no plasma.

Foi estudado o composto canferol, um dos constituintes da fração *n*-butanol das folhas da *B. forficata*, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. A glicemia foi acompanhada durante um período agudo (0, 1, 2 e 3 horas) após o tratamento por via oral em ratos diabéticos conforme mostrado na figura 19. Nenhuma das três doses foi significativa em reduzir a glicemia dos animais tanto comparado aos respectivos tempos zero quanto ao controle diabético.

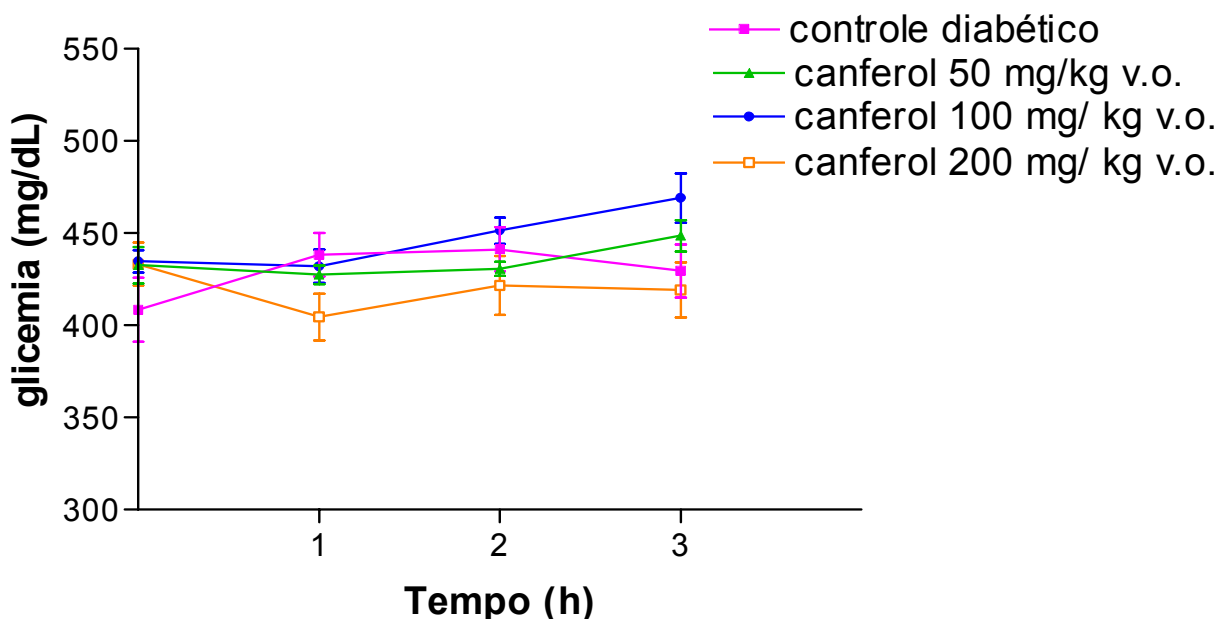


Figura 19. Efeito agudo da administração do canferol (via oral) isolado das folhas de *Bauhinia forficata* em ratos diabéticos induzidos por aloxana. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n= 5).

Outros flavonóides com estrutura semelhante ao canferol, como a quercetina, a miricetina, a naringenina, possuem atividade hipoglicemiante comprovada. Por exemplo, a quercetina, quando administrada por via oral em doses de 10-50 mg/kg de peso corporal foi capaz de normalizar os níveis de glicose plasmática, aumentar o conteúdo de glicogênio hepático e reduzir o colesterol e LDL no soro de ratos diabéticos (NURALIEV; AVEZOV, 1992). A miricetina, estimula a captação de glicose no tecido adiposo, não afeta a

autofosforilação do receptor de insulina nem a atividade tirosina-quinase deste receptor (ONG;KHOO, 1996,2000).

Flavonóis, isoflavonas, flavonas e antocianinas geralmente são glicosiladas e o açúcar comumente ligado é a glicose ou a ramnose. A glicosilação influencia as propriedades químicas, físicas e biológicas dos polifenóis, além de afetar a absorção dos mesmos pelas células intestinais (TAPIERO et al., 2002). Por exemplo, em estudo realizado por Scalbert et al. (2002), a absorção dos glicosídeos da quercetina foi avaliada em voluntários ileostomizados. A absorção dos glicosídeos foi maior (52%) que a da aglicona (24%). Ao contrário, os ramnosídeos da quercetina foram menos absorvidos nas mesmas condições.

O trabalho de De Sousa e colaboradores (2004) e Jorge e colaboradores (2004) demonstraram que o composto canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo apresentou efeitos hipoglicemiantes significativos. Comparando este resultado com o obtido para o canferol livre e a literatura disponível, podemos inferir que a presença dos açúcares ligados à estrutura básica dos flavonóides é importante para a atividade hipoglicemiante.

Um outro flavonóide presente na fração *n*-butanol das folhas da *B. forficata* e com estrutura química muito semelhante ao canferol foi estudado neste modelo. Após os compostos glicosilados desta fração em estudo passarem por um processo de hidrólise, foi obtida a quercetina para estudar o efeito agudo por via oral em ratos diabéticos. A dose escolhida foi 100 mg/kg para o tratamento.

Como pode ser observado na figura 20, a administração da quercetina em animais diabéticos apresentou leve efeito hipoglicemiante (7,8%) na primeira hora após o tratamento. Após, a glicemia voltou a níveis similares ao tempo zero.

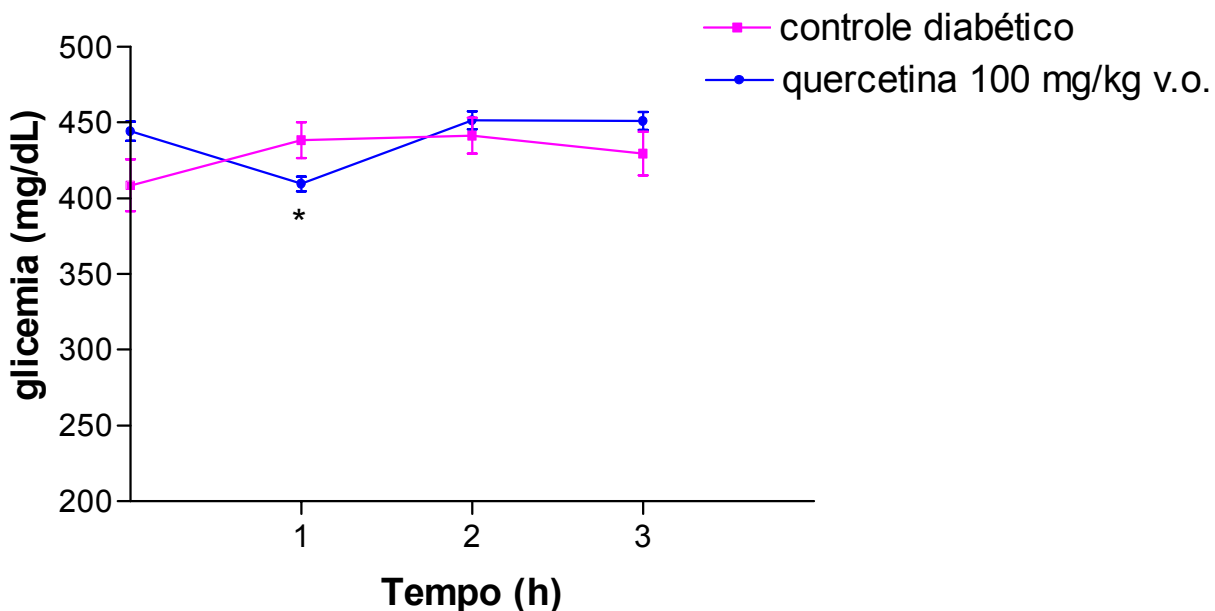


Figura 20. Efeito agudo da quercetina (100 mg/kg) via oral (v.o.) em ratos diabéticos induzidos por aloxana. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n= 5). \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao respectivo tempo zero.

Segundo estudo realizado por Vessal e colaboradores (2003), a quercetina administrada nas doses de 10 e 15 mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal, não apresentou efeito sobre os níveis glicêmicos de animais normais, não alterou a curva de tolerância à glicose, nem a atividade da hexoquinase hepática. Neste mesmo ensaio, a quercetina reduziu significativamente a glicemia dos animais diabéticos em 8 a 10 dias de tratamento com as duas doses utilizadas, aumentou as atividades das enzimas hexoquinase e glicoquinase hepáticas e normalizou as curvas de tolerância à glicose em ratos diabéticos. Foi observado também um aumento significativo do número de ilhotas pancreáticas tanto em animais normais quanto diabéticos. Ainda, de acordo com Vessal e colaboradores, os efeitos benéficos da quercetina relatados neste trabalho poderiam ser atribuídos a habilidade da quercetina em regenerar as células  $\beta$  pancreáticas e aumentar a liberação de insulina.

Contrastando ao relatado no trabalho de Scalbert, resultados usando células Caco-2 indicam que embora os glicosídeos da quercetina sejam capazes de passar através de monocamadas de células, sua eficiência é muito menor do que a da aglicona. Isso reforça a idéia que a hidrólise dos glicosídeos da quercetina substancialmente acelera a absorção no intestino delgado (MUROTA; TERAQ, 2003).

Piskula e Terão (1998) mostraram que a solubilidade da quercetina nos veículos utilizados para a administração em ratos, influencia grandemente a eficiência da absorção da quercetina. Apoiado nestas observações e nos efeitos já descritos para a quercetina anteriormente, o resultado obtido na glicemia com a administração da dose de 100 mg/kg por via oral, poderia certamente corroborar os descritos por Nuraliev; Avezov (1992) e os de Vessal et al. (2003) utilizando-se modelos de animais diabéticos que possibilitem o estudo de um período sub-crônico e/ou crônico.

No trabalho de De Sousa (TCC), desenvolvido em nosso laboratório, foi demonstrado que tanto o extrato quanto as frações *n*-butanol e acetato de etila não apresentaram efeito hipoglicemiante significativo em ratos normais e diabéticos tratados diariamente por até um período de trinta dias o que nos levou a substituir um tratamento sub-crônico por um modelo de tratamento agudo. Também, devido a fração de acetato de etila sempre mostrar uma forte tendência a diminuir a glicemia nos tratamentos sub-crônicos foi que decidimos testar esta fração em tratamentos agudos como o que descrevemos nesta dissertação.

Como já descrito nesta dissertação (na seção introdução), resultados anteriores deste laboratório dos estudos do efeito hipoglicemiante do extrato, frações e alguns compostos das folhas da *B. forficata*, mostraram uma forte atividade hipoglicemiante e deste sistema todo em estudo, um composto, o canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (K-diRh) foi o melhor estudado (DE SOUSA, TCC; SILVA et al., 2002; DE SOUSA et al., 2004; JORGE et al., 2004). Portanto,

estes resultados prévios despertaram o interesse para que o estudo principal desta dissertação fosse a elucidação da relação estrutura-atividade entre os flavonóides glicosilados ou não e, por isso, temos como referência o canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo na dose de 100 mg/kg (melhor efeito hipoglicemiante em animais diabéticos) num período agudo de tratamento.

A figura 21 mostra o efeito do canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo (100 mg/kg) num período agudo (0, 1, 2, 3, 6 e 24 horas) por via intraperitoneal (figura 21A) em comparação a um período agudo (0, 1, 2 e 3 horas) por via oral do composto (mesma dose e mesma origem) na glicemia de animais diabéticos. Esta figura tem por propósito mostrar não só a potência do composto mas também elucidar a via mais efetiva para uma melhor ação hipoglicemiante.

Os efeitos do K-diRh foram estudados quando o composto foi administrado pela via intraperitoneal na dose de 100 mg/kg a ratos diabéticos em jejum de aproximadamente 16 horas por um período mais longo de tratamento do usualmente estudado para este composto. Conforme demonstra a figura 21A, o K-diRh apresentou efeito hipoglicêmico nos tempos 1, 2, 3 e 6 horas após a administração quando comparado ao respectivo tempo zero, sendo que a atividade hipoglicemiante máxima foi observada na terceira hora após o tratamento (20,3%). Quando comparado ao controle diabético a redução da glicemia foi significativa até a terceira hora.

Com o objetivo de esclarecer o tempo de absorção deste composto, Jorge 2003, observou que o K-diRh (100 mg/kg) administrado pela via oral também teve efeito hipoglicemiante no período de 1 a 6 horas após o tratamento, sendo que a atividade máxima foi observada na terceira hora (21,5%). Como pode ser observado, independente da via de administração, o K-diRh, que possui duas ramnosés ligadas à estrutura fenólica nas posições 3 e 7, apresentou efeitos significativos na redução da glicemia nos períodos de 1 a 6 horas em animais diabéticos tanto por via oral (JORGE, 2003) quanto por intraperitoneal (figura 21A).

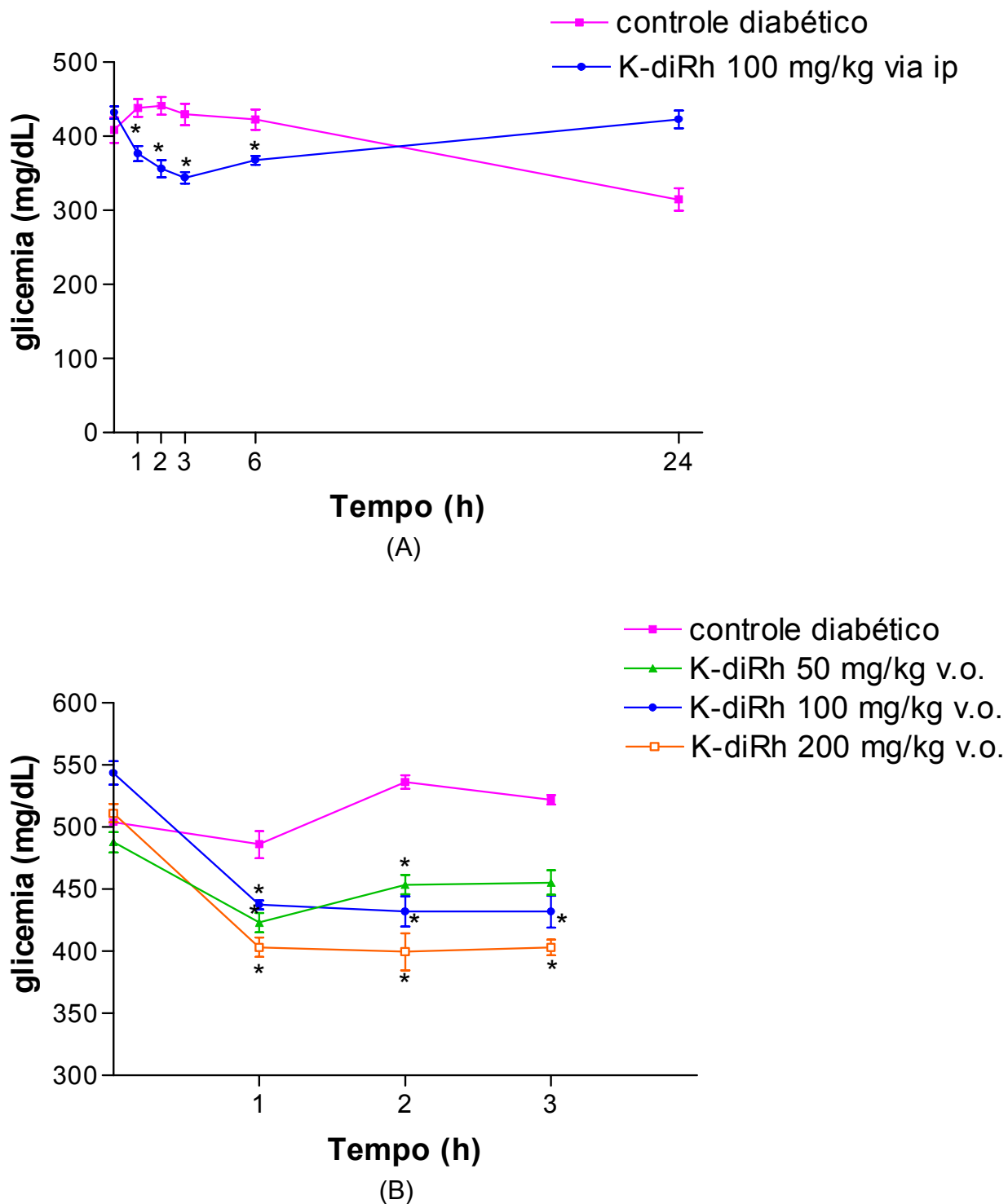


Figura 21. Efeito agudo do canferol 3,7-O- $\alpha$ -L-diramnosídeo isolado das folhas de *Bauhinia forficata* em ratos diabéticos induzidos por aloxana. (A) Intraperitoneal; (B) Via oral por gavagem (Adaptado de DE SOUSA , 2003). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n= 5). \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado com o respectivo tempo zero.

O K-diRh (curva dose-resposta) pela via oral, descrito por De Sousa, 2003, em todas as doses testadas apresentou uma queda significativa na glicemia. A dose de 50 mg/kg apresentou uma redução na glicemia após 1 e 2 horas de tratamento, sendo a queda máxima em 1 hora após o tratamento (13,3%). Já as doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram efeito hipoglicêmico durante todo o período estudado. As atividades máximas foram de 20,5% e 21,5% na segunda hora após o tratamento, respectivamente. Entretanto, na administração das mesmas doses de 50, 100 e 200 mg/kg em ratos normais, apenas a dose mais alta do composto apresentou uma queda significativa na glicemia após 1 hora de tratamento (DE SOUSA et al., 2004). Comparando-se novamente com os resultados do canferol (figura 19) e da quercetina (figura 20), podemos observar que a presença de açúcares ligados à estrutura flavonoídica parece importante para a atividade hipoglicemiante dos compostos administrados por via oral.

Conforme descrito na literatura, em estudo realizado por Zarzuelo e colaboradores (1996), ratos diabéticos foram tratados com luteolina 5-O- $\beta$ -rutinosídeo (flavonóide glicosilado) na dose de 2 mg/kg por via oral durante 20 dias. A administração do composto resultou em um aumento significativo dos conteúdos de ADN e insulina pancreáticos. Os resultados apontam que este flavonóide reduziu significativamente a glicemia sem alterar os níveis de insulina plasmáticos.

Ainda, a silimarina, outro flavonóide encontrado em plantas, possui efeitos antioxidantes protetores em vários modelos experimentais. Em estudo realizado por Soto e colaboradores (1998), a silimarina (doses de 200 mg/kg via oral) preveniu o aumento dos níveis de glicose plasmática induzido pela aloxana em ratos quando tratados por um período agudo (0 a 130 horas).



### 5.3.2 Provenientes do caule fresco da *Cyathea phalerata*

A sintomatologia clássica do diabetes é decorrente da hiperglicemia crônica e da hiperosmolaridade, refletindo no metabolismo glicídico, lipídico e protéico, sendo característica a perda de peso, poliúria, polidipsia, polifagia, diurese osmótica e glicosúria. As conseqüências a longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam à disfunção, dano ou falência de vários órgãos (CONSENSO BRASILEIRO DE DIABETES, 2002; BEARDSALL, et al., 2003). Há um interesse crescente nas aplicações terapêuticas de plantas medicinais e de bioflavonóides no tratamento e prevenção de doenças, inclusive o diabetes, porém a maioria dos estudos mostram o efeito dos flavonóides como potenciais antioxidantes e poucos são os estudos relacionados com o metabolismo de carboidratos (ONG; KHOO, 2000; VESSAL et al., 2003).

Espécies representantes da família Cyatheaceae, acumulam flavonóis O-glicosídeos, predominantemente 3-O-glicosídeos do canferol e quercetina e C-glicosilflavonas e flavanonas (HIRAOKA; HASEGAWA, 1975; HIRAOKA; MAEDA, 1979; WALLACE, 1989). Cunha et al. (2003) realizaram o estudo fitoquímico da *Cyathea phalerata* (*C. phalerata*), resultando no isolamento e caracterização estrutural de dois flavonóides glicosilados contendo o canferol e o ácido caféico como agliconas: ácido-3-O- $\beta$ -D-glicopiranosilcaféico e canferol 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo.

Apoiado nos resultados obtidos com o K-diRh e de outros flavonóides descritos na literatura como hipoglicemiantes (ONG; KOO, 1996, 2000; ZARZUELO et al., 1996; JORGE, 2003; VESSAL et al., 2003; DE SOUSA et al., 2004), foi estudado o flavonóide canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (K-3RhG) na glicemia de ratos diabéticos. Devido ao fato de que os flavonóides anteriormente estudados apresentaram pouco ou nenhum efeito na glicemia de animais normais, optou-se por realizar os ensaios somente em ratos diabéticos.

O flavonóide canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi testado nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg por via oral em animais diabéticos induzidos por aloxana. Os níveis glicêmicos foram estudados durante os tempos 0, 1, 2 e 3 horas após o tratamento.

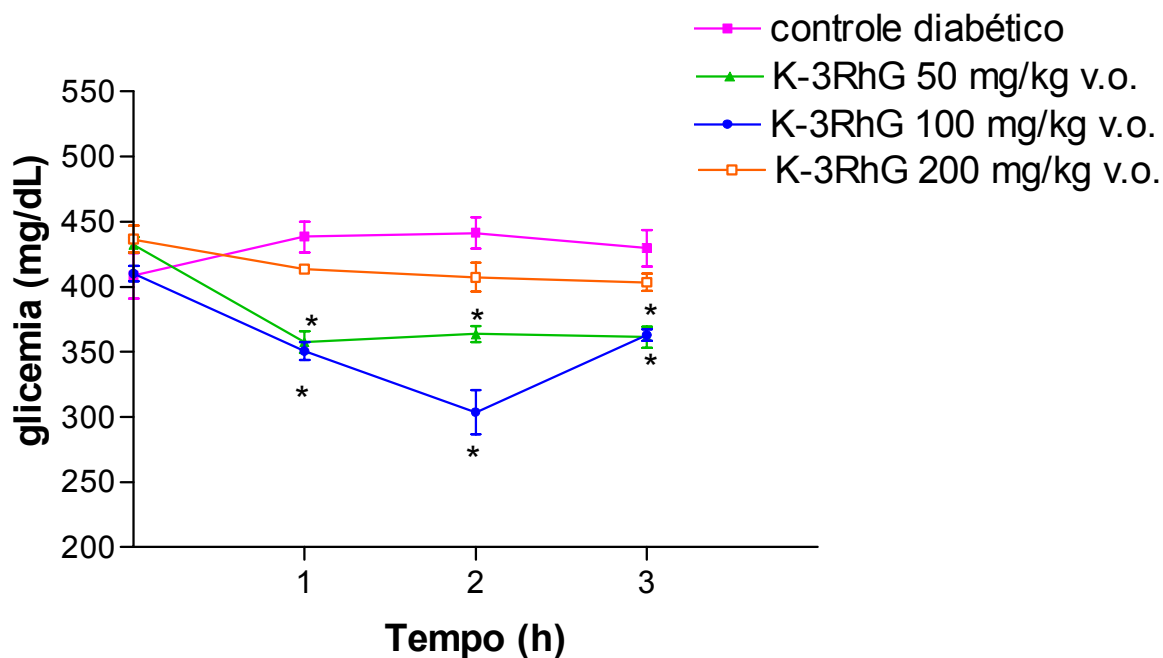


Figura 22. Curva de dose-resposta do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (via oral), isolado do caule fresco de *Cyathea phalerata* em ratos diabéticos induzidos por aloxana. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n= 5). \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado com o respectivo tempo zero.

A dose de 50 mg/kg apresentou uma redução significativa na glicemia em todo o período estudado, sendo a queda máxima em 1 hora após o tratamento (17,2%), mantida durante o restante do tempo. A dose de 100 mg/kg exibiu efeitos hipoglicemiantes significativos durante todo o tempo avaliado. A atividade hipoglicêmica máxima ocorreu nas duas horas e foi de 25,9% em relação ao tempo zero. Apesar dos valores na terceira hora das doses de 50 e 100 mg/kg terem aumentado, eles ainda apresentam-se significativamente abaixo dos valores de tempo zero respectivo para cada grupo, assim como, abaixo do grupo controle diabético de 1 a 3 horas.

Por outro lado, a dose de 200 mg/kg não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao respectivo tempo zero. O composto nesta dose (a maior por nós estudada) apresentou um comportamento praticamente igual ao grupo controle. Em resultados anteriores com a fração *n*-butanol da *B. forficata* demonstramos que as doses mais altas estudadas (600 e 800 mg/kg) estatisticamente significativas como hipoglicemiante em animais diabéticos, não mostraram diferenças significativas entre as doses (SILVA et al., 2002). Fato semelhante também ocorreu quando utilizamos o composto canferitrim purificado das folhas da *B. forficata* para estudar o efeito agudo deste composto em ratos diabéticos. As doses mais altas estudadas, ambas com efeito hipoglicemiante não mostraram diferença entre o efeito das duas (DE SOUSA et al., 2004). Fazendo uma analogia a nossa experiência com o mecanismo de ação de hormônios (tri-iodotironina,  $T_3$ ) e o  $1\alpha, 25-(OH)_2$  vitamina  $D_3$  (substâncias altamente purificadas) quando foram estudadas em tecidos alvos que conhecidamente possuem receptores para estas substâncias (célula de Sertoli e enterócito de pinto, respectivamente), também mostraram um efeito semelhante a um platô em função de doses crescentes (SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2002; VOLPATO et al., 2004; NORMAN et al., 2002). Considerando o que acontece em função da dose dos hormônios que já estudamos e ao que temos observado com os compostos naturais, temos como meta estudar os parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ) destes compostos na captação de glicose em um tecido alvo da insulina (músculo sóleo) no intuito de esclarecer o(s) possíveis sítios de ligação para estes compostos em sistemas biológicos *in vitro*.

A figura 23 mostra o efeito do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (dose escolhida em função do efeito na curva dose-resposta) após um período longo de tratamento pela via intraperitoneal.

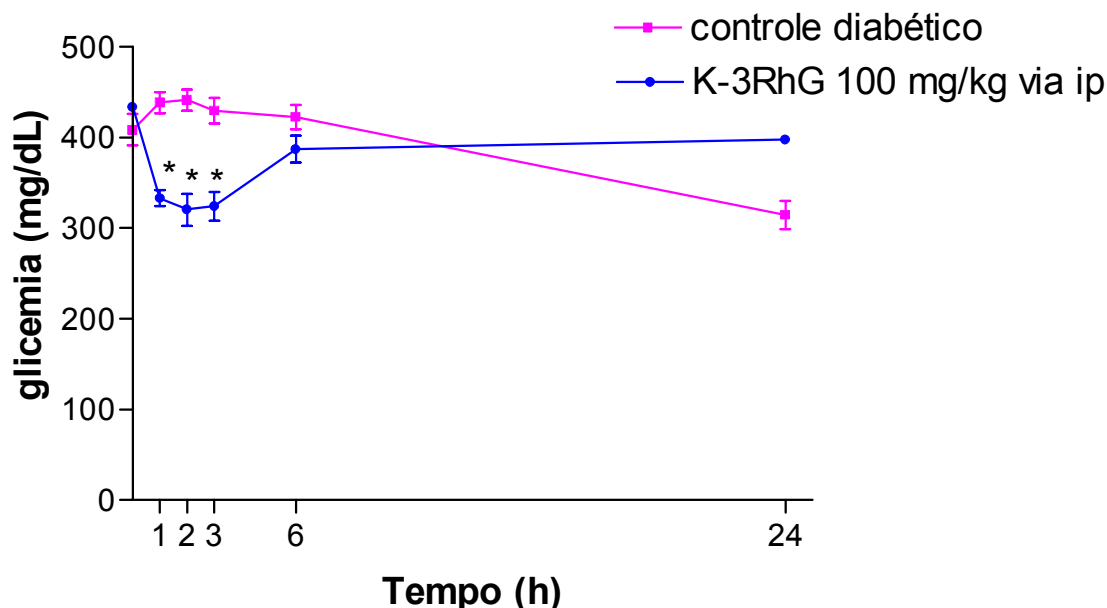


Figura 23. Efeito agudo do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (via intraperitoneal) isolado do caule fresco de *Cyathea phalerata* em ratos diabéticos induzidos por aloxana. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n= 5). \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado no respectivo tempo zero.

O canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo administrado por via intraperitoneal na dose de 100 mg/kg apresentou efeito hipoglicêmico nos tempos 1, 2 e 3 horas após a administração quando comparado ao respectivo tempo zero, bem como, quando comparado ao controle diabético.

Estes resultados estão de acordo com o relatado na literatura para períodos agudos (0-3 horas) e prolongados (0-24 horas) de tratamento por via oral para o K-diRh (JORGE, 2003; DE SOUSA et al., 2004). Comparando-se os resultados do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (figura 23) com os da figura (K-diRh) (figura 21A), podemos observar que o flavonóide da *C. phalerata* (figura 23) apresentou uma redução significativa na glicemia de zero a três horas enquanto o K-diRh (figura 21A, via i.p) teve um efeito hipoglicêmico significativo até as seis horas após o tratamento, seguindo protocolo experimental semelhante. Ainda que o período de ação do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-

glicopiranosídeo tenha sido menor, a potência hipoglicemiante deste composto no mesmo período (de 0 a 6 h) foi melhor que o K-diRh.

É possível que o K-diRh (*B. forficata*) e o canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*C. phalerata*) exerçam um efeito proeminente na glicemia de animais diabéticos através da ativação no metabolismo da glicose em tecidos sensíveis à insulina, uma vez que a aloxana causa a destruição das células  $\beta$ .

Os flavonóides já demonstraram efeitos no metabolismo da glicose como por exemplo, a quercetina que é um potente bloqueador da fosforilação de substratos exógenos catalizada pela tirosina quinase do receptor de insulina. Em adipócitos isolados de ratos, a quercetina inibiu os efeitos estimulatórios da insulina no transporte, oxidação e incorporação da glicose em lipídios e também a lipogênese. A autofosforilação do receptor de insulina estimulada pelo hormônio e o efeito da insulina em inibir a lipólise não foram afetados pela quercetina (SHISHEVA; SHECHTER, 1992). Além dela, a miricetina, outro flavonóide amplamente distribuído em plantas, estimula a captação de glicose no tecido adiposo por aumentar a velocidade de captação ( $V_{m\acute{a}x}$ ), sem alterar o  $K_m$ . Também foi demonstrado neste mesmo tecido que a miricetina não afeta a autofosforilação do receptor de insulina nem a atividade tirosina-quinase deste receptor. Através de métodos de imunodeteção estes autores mostraram que a estimulação da captação de glicose pela miricetina não é por consequência do estímulo da translocação do transportador de glicose para a membrana plasmática (ONG;KHOO, 1996, 2000). Já a silimarina, outro flavonóide extraído de plantas, apresenta uma atividade anti-hiperglicêmica por proteger as células  $\beta$  pancreáticas do estresse oxidativo e não por agir diretamente no metabolismo da glicose (SOTO et al., 1998).

As relações estrutura-atividade dos flavonóides são estudadas extensivamente para melhor entendimento de quais características estruturais são mais importantes nas várias funções. Contudo, a ampla presença na natureza, a

diversidade de formas e as mudanças metabólicas dos flavonóides resultam em dificuldades para a elucidação destas relações (SATTERFIELD; BRODBLET, 2001).

Os flavonóides são amplamente distribuídos em plantas e bebidas como conjugados glicosídicos, nos quais um ou mais grupos açúcares estão ligados aos grupos fenólicos por ligações glicosídicas (TAPIERO et al., 2002; MUROTA; TERAQ, 2003). Embora o mecanismo preciso de absorção pelas células intestinais seja desconhecido, o centro açúcar do glicosídeo parece ser um determinante importante para o sítio de absorção. Como exemplo, a quercetina derivada dos alimentos que se encontra principalmente como seus glicosídeos e a efetividade da absorção e das ações é amplamente modificada pela posição do grupo açúcar ligado à estrutura fenólica básica. Além disso, os glicosídeos contendo glicose são provavelmente melhor absorvidos do que outros açúcares comumente encontrados em flavonóides (MUROTA; TERAQ, 2003).

A partir dos resultados expostos, propôs-se que o mecanismo hipoglicêmico do K-diRh envolveria um efeito tipo insulina por influenciar no consumo periférico de glicose, ou potenciação do efeito da insulina residual e menos provavelmente por inibição da reabsorção de glicose pelo rim ou redução no catabolismo da insulina (inibição das insulinas). Outro ponto relevante é que o efeito hipoglicêmico do K-diRh em ratos diabéticos foi marcadamente mais potente (cerca de 4 vezes) quando comparado à fração *n*-butanol da *B. forficata* (fração de onde foi obtido este composto) usando um protocolo semelhante, enfatizando então, a importância do K-diRh na fração (DE SOUSA et al., 2004).

O canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo possui a estrutura semelhante ao K-diRh, difere no tipo e posição dos açúcares ligados, uma ramnose ligada na posição 3 e uma glicose unida a ramnose por ligação glicosídica. Este apresentou uma ação hipoglicemiante mais potente que os compostos isolados da *B. forficata*, especialmente o K-diRh. Desse modo,

podemos sugerir que o tipo e a posição dos açúcares unidos à estrutura fenólica dos flavonóides é de importância fundamental para a atividade hipoglicêmica dos mesmos. Isso está de acordo com relatos da literatura sobre a importância dos açúcares na absorção e no metabolismo dos flavonóides, bem como nos efeitos fisiológicos e nas características de hidro e lipofilicidade dos mesmos como por exemplo os estudos de Murota e Terão (2003), Scalbert et al. (2002) e Tapiero et al., (2002). Neste sentido, ainda são necessários estudos para elucidar o modo de absorção dos flavonóides glicosilados.

Foi demonstrado em trabalhos anteriores deste laboratório que os flavonóides glicosilados das folhas da *B. forficata*, especificamente o K-diRh, possui um potencial efeito hipoglicemiante no diabético moderado. Este composto, num período agudo, apresentou efeito melhorado na redução da glicemia após ser incorporado em membranas lipossômicas. Além disso, o K-diRh mostrou uma ação insulino-mimética na captação de [ $^{14}\text{C}$ ] DG, sem no entanto alterar a síntese protéica. Estes dados levantam a hipótese de que este composto possa estar atuando na velocidade de entrada da glicose ( $V_{m\acute{a}x}$ ) nas células e/ou na translocação dos carregadores de glicose para a membrana plasmática (JORGE et al., 2004). Uma vez que, não afetou a glicosúria (JORGE, 2003) e conforme demonstrado por De Sousa (2003) o composto também não alterou a absorção intestinal da glicose e não influenciou a curva de tolerância à glicose. Estes resultados também reforçam que o efeito do K-diRh seja principalmente através da regulação da glicose nos tecidos sensíveis à insulina.

Estudos complementares para a elucidação da bioatividade do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (*C. phalerata*) e do K-diRh (*B. forficata*) na glicemia, na captação da glicose em tecidos alvo da insulina, no estudo das constantes cinéticas da captação de glicose sob a regulação do composto em tecido muscular são objetivos pertinentes para melhor compreensão da bioatividade destes compostos.

## Parte II

### 5.4 Estudos de Equilíbrio Químico do Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-Diramnosídeo-VO(IV) e do Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-Ramnopiranosil- $\beta$ -D-Glicopiranosídeo-VO(IV)

#### 5.4.1 Medidas do Equilíbrio Potenciométrico do Sistema Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV)

As curvas de titulação potenciométrica do sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) são mostradas na Figura 24. A curva A representa o canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo livre e a curva B representa o sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) na razão 2:1.

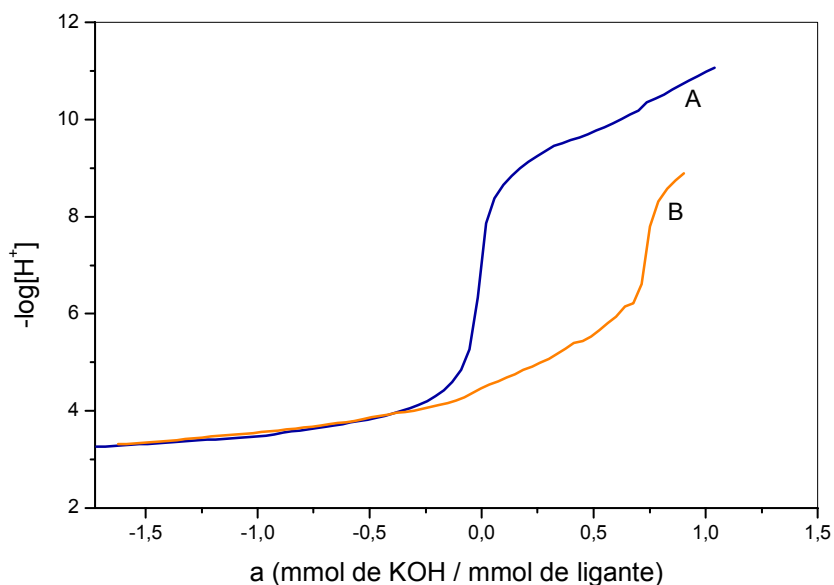


Figura 24. Curvas dos equilíbrios potenciométricos para o sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) a  $25,00 \pm 0,05$  °C e força iônica  $\mu = 0,100$  mol/L (KCl). A) 0,05478 mmol de canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo em 35,00 mL de solução EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30); B) 0,05490 mmol canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e 0,02610 mmol de VO(IV) em 35,00 mL de solução EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30).



Os valores negativos na abscissa são quantidades de ácido adicionado em excesso e neutralizado pela base. A curva A mostra duas regiões tamponadas, uma em valores baixos de pH devido à neutralização do excesso de ácido adicionado e o segundo tampão entre pH 8,5 até 10,5 , devido ao equilíbrio ácido-base do ligante (canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo). A curva B mostra uma região tampão até  $a = 0,75$  mol de KOH/mol de ligante, correspondendo a neutralização de 0,75 mol de prótons do ligante. Os experimentos foram interrompidos em pH 9,0 devido à precipitação, provavelmente um produto da hidrólise do íon metálico (VO(IV)).

As constantes dos equilíbrios de protonação e a formação das espécies complexadas do canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo com o íon VO(IV) são definidas pelas Equações 1 - 4, onde  $L^{2-}$  e  $H_2L$  representam as espécies desprotonada e protonada do ligante, respectivamente;  $VO^{2+}$  é o íon metálico aquoso e  $VOHL^+$  e  $VOH_2L_2$  são as espécies 1:1 e 1:2 (metal:ligante). Estas foram as únicas espécies complexadas detectadas e são mono- e diprotonadas, respectivamente. Os valores das constantes desses equilíbrios estão listados na Tabela 3 e são definidas pelos equilíbrios 1 - 4.

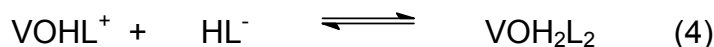
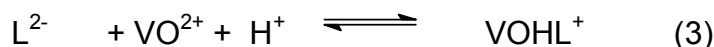
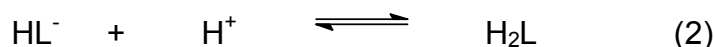
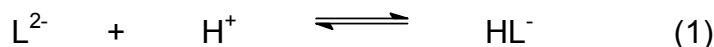


Tabela 3: Constantes de protonação do canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosideo e constantes de ligação com íon metálico VO(IV) a  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100$  mol/L (KCl).

Espécies	Log K
$[\text{HL}^-]/[\text{H}^+][\text{L}^{2-}]$	$12,65 \pm 15,0$
$[\text{H}_2\text{L}]/[\text{HL}^-][\text{H}^+]$	$9,14 \pm 3,0$
$[\text{VOHL}^+]/[\text{L}^{2-}][\text{VO}^{2+}][\text{H}^+]$	$20,6 \pm 2,0$
$[\text{VOH}_2\text{L}_2]/[\text{VOHL}^+][\text{HL}^-]$	$19,9 \pm 3,0$

As curvas de distribuição das espécies do sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) (2:1) em função de  $-\log[\text{H}^+]$  são mostradas na Figura 25. A percentagem de formação foi calculada considerando o íon metálico como 100%. O íon metálico e o canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosideo livres em solução aparecem em valores de pH baixos e diminuem conforme o pH aumenta, dando origem a espécie VOHL (1:1 monoprotionada) que é formada 55% em pH 4,7. Esta espécie diminui em valores de pH maiores dando espaço à espécie VOH<sub>2</sub>L<sub>2</sub> (1:2 diprotionada), que é a espécie predominante em pH fisiológico (7,4) com 95% de formação.

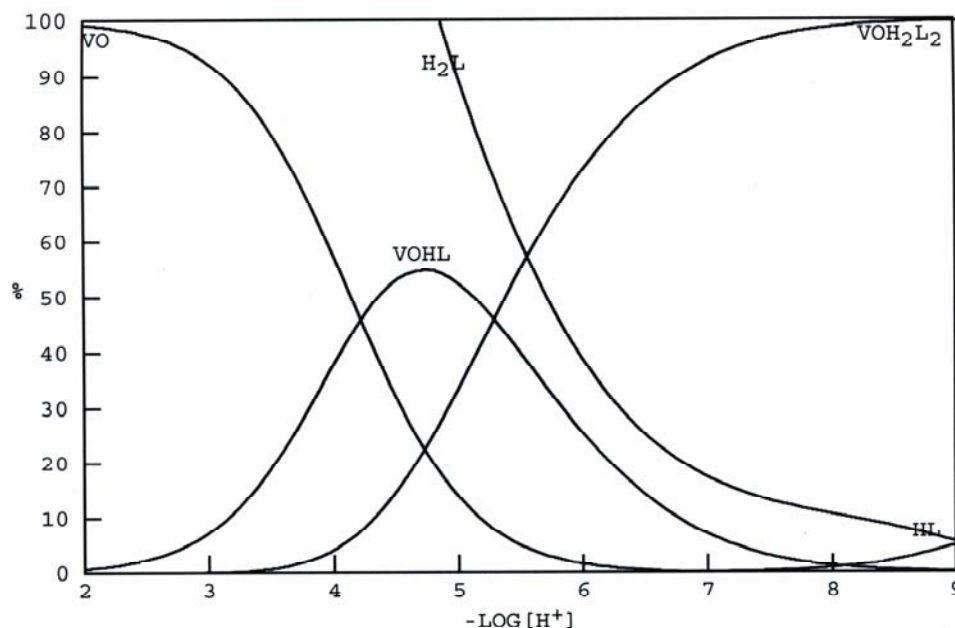


Figura 25. Curvas de distribuição de espécies do sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) em função de  $-\log[H^+]$  para uma solução contendo 0,05490 mmol canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e 0,02610 mmol de VO(IV) a  $25,00 \pm 0,05$  °C e força iônica  $\mu = 0,100$  mol/L (KCl).

A estrutura proposta que melhor representa a interação do sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) (2:1) em pH 7,4 é mostrada na Figura 26.

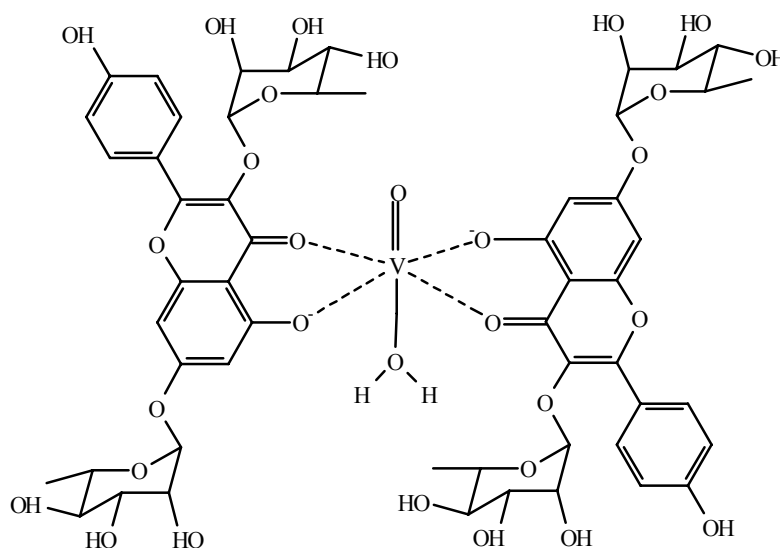


Figura 26. Estrutura proposta para a interação do sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) (2:1).

#### 5.4.2. Medidas do Equilíbrio Potenciométrico do Sistema Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV)

As curvas de titulação potenciométrica do sistema canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) são mostradas na Figura 27. A curva A representa o canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo livre e a curva B representa o sistema canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) complexado na razão 1:1. Os valores negativos na abscissa são quantidades de ácido adicionado em excesso e neutralizado pela base. A curva A tem duas regiões tamponadas, uma em valores baixos de pH devido à neutralização do excesso de ácido adicionado e o segundo tampão entre pH 8,0 - 10,0, devido ao equilíbrio ácido-base do ligante (canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo). A curva B possui uma região tampão até  $a = 1,0$  mmol de KOH/mmol de ligante, correspondendo a neutralização de 1,0 mmol de prótons do ligante. Os experimentos foram interrompidos em pH 8,0, devido à precipitação, provavelmente um produto da hidrólise do íon metálico (VO(IV)).

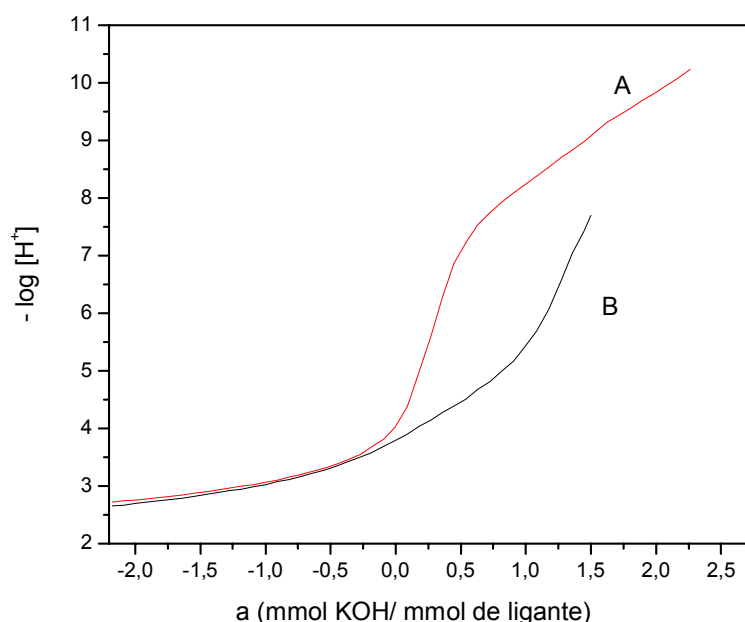


Figura 27. Curvas dos equilíbrios potenciométricos para o sistema canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) a  $25,00 \pm 0,05$  °C e força iônica

$\mu = 0,100$  mol/L (KCl). A) 0,0503 mmol de canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo em 50,00 mL de solução EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30); B) 0,0503 mmol canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-diramnosídeo e 0,0503 mmol de VO(IV) em 50,82 mL de solução EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30).

As constantes dos equilíbrios de protonação e a formação das espécies complexadas do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo com o íon VO(IV) são definidas pelas Equações 5 - 9, onde  $L^{3-}$ ,  $HL^{2-}$ ,  $H_2L^-$  e  $H_3L$  representam as espécies completamente desprotonada, mono-, di- e triprotonada do ligante, respectivamente;  $VO^{2+}$  é o íon metálico aquoso e VOHL e  $VOH_2L^+$  são as espécies 1:1 mono- e diprotonadas dos complexos formados respectivamente. Os valores das constantes definidas pelos equilíbrios 5 – 9 estão listadas na Tabela 4.

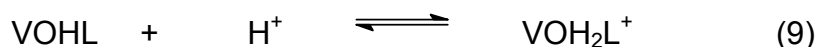
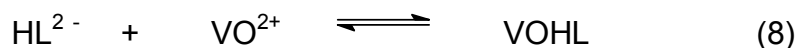
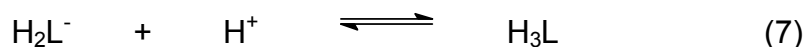
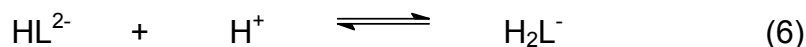
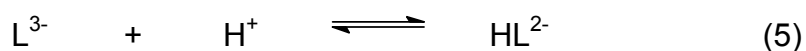


Tabela 4: Constantes de protonação do canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo e constantes de ligação com íon metálico VO(IV) a  $25,00 \pm 0,05$  °C e  $\mu = 0,100$  mol/L (KCl).

Espécies	Log K
$[HL^{2-}]/[H^+][L^{3-}]$	12,65 (15,0)*
$[H_2L^-]/[HL^{2-}][H^+]$	9,11 (3,0)
$[H_3L]/[H_2L^-][H^+]$	7,17 (2,0)
$[VOHL]/[VO^{2+}][HL^{2-}]$	21,04 (3,0)
$[VOH_2L^+]/[VOHL][H^+]$	6,62 (3,0)

\* os valores entre parênteses correspondem à diferença entre os últimos algarismos.

As curvas de distribuição das espécies do sistema canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) (1:1) em função de  $-\log[H^+]$  são mostradas na Figura 28. A percentagem de formação foi calculada considerando o íon metálico como 100%. O íon metálico e o canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo livres em solução aparecem em valores baixos de pH e diminuem conforme o pH aumenta, dando origem a espécie VOH<sub>2</sub>L que é formada 58,7% em pH 5,4. Esta espécie tende a diminuir com valores maiores de pH, sendo substituída pela VOHL. Em pH fisiológico, a espécie predominante com 78,5% de formação é a VOHL.

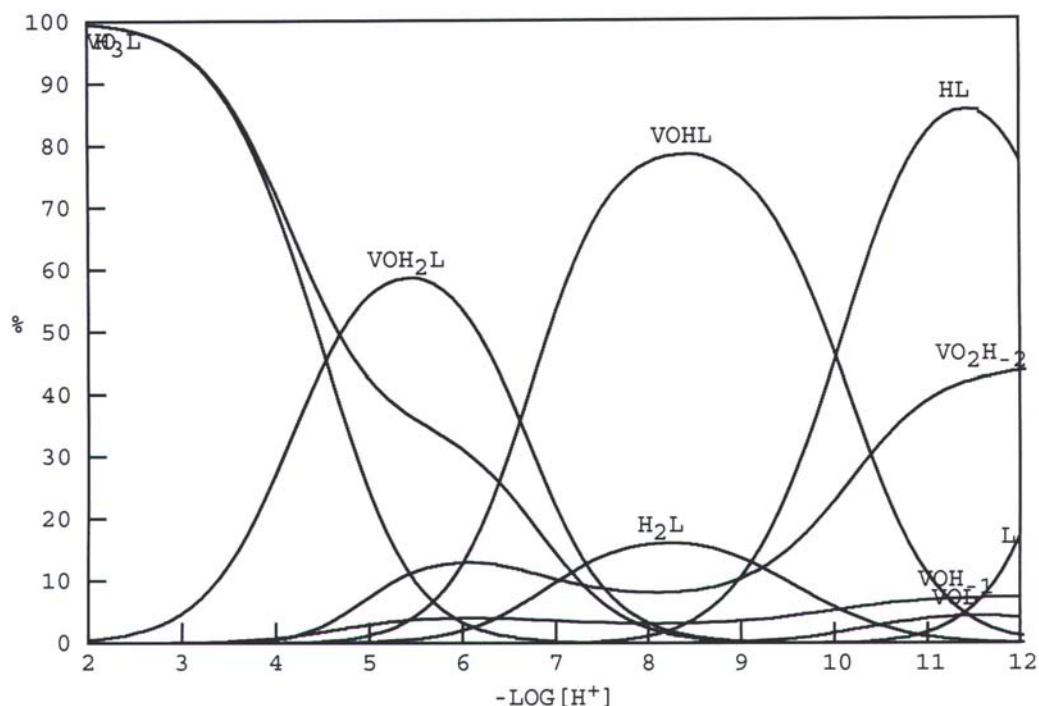


Figura 28. Curvas de distribuição de espécies do sistema canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) em função de  $-\log[H^+]$  para uma solução contendo 0,0503 mmol canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo e 0,0503 mmol de VO(IV) a  $25,00 \pm 0,05$  °C e força iônica  $\mu = 0,100$  mol/L (KCl).

A estrutura proposta para o complexo que predomina em pH neutro e levemente básico (VOHL) é mostrada na Figura 29.

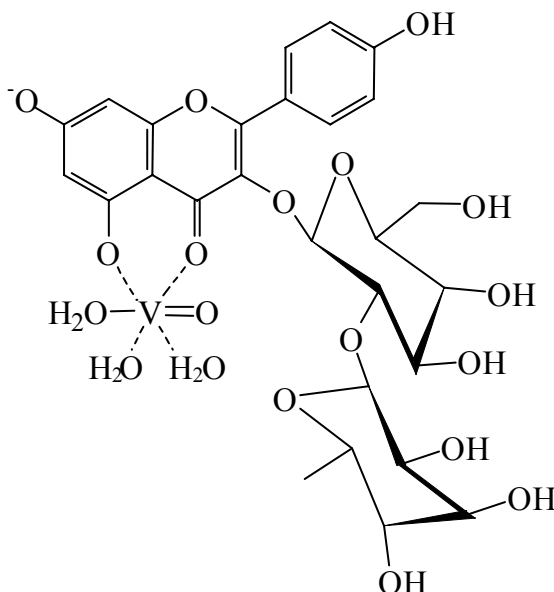


Figura 29. Estrutura proposta para a interação do sistema canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo:VO(IV) (1:1).

## 5.5 Estudo da Atividade Hipoglicemiante dos Complexos Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-Diramnosídeo-VO(IV) (2:1) e Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-Ramnopiranosil $\beta$ -D-Glicopiranosídeo- VO(IV) (1:1)

### 5.5.1 Efeito Agudo da Administração por Via Oral e Intraperitoneal do Vanádio (IV) em Ratos Diabéticos

O vanádio é um elemento traço, amplamente distribuído na natureza, no entanto, a função fisiológica específica deste metal em mamíferos ainda não está completamente esclarecida. No passado, os compostos de vanádio eram amplamente usados como agentes terapêuticos (para anemia, tuberculose, cáries dentais e diabetes), como anti-séptico e como tônico (NRIAGU, 1998; SHECHTER et al., 2003).

Evidências sugerem que o vanádio atue semelhantemente a insulina. Recentemente, íons de vanádio, como vanadato ( $\text{VO}_3^-$ , estado de oxidação 5+) e vanadil ( $\text{VO}^{2+}$ , estado de oxidação 4+) vêm sendo utilizados para aliviar a sintomatologia em ratos diabéticos e são descritos como substâncias hábeis em diminuir a glicemia destes animais (TSUJI; SAKURAI, 1996; SAKURAI et al., 2002; THOMPSON et al., 2004).

Como o vanádio (IV) é a principal forma química do metal encontrada em tecidos e órgãos, é conhecido por ser menos tóxico do que o vanádio (V) (SAKURAI et al., 2002) e é preferido por parte dos pesquisadores, o vanádio na forma 4+ foi escolhido para o desenvolvimento desta dissertação. A comparação entre estudos anteriores pode tornar-se difícil devido a diferenças na severidade do diabetes dos animais, na duração dos tratamentos e nas doses e tipo de sais de vanádio administradas.

Foi estudado o vanádio (IV), na forma de sulfato de vanadila, na dose de 0,0146 mmol em ratos diabéticos por um período mais longo de tratamento (0–24 horas) devido a absorção lenta do vanádio. Dentro deste período, o vanádio(IV) não apresentou efeito hipoglicêmico conforme a figura 30, concordando com os dados de Yuen e colaboradores (1997).



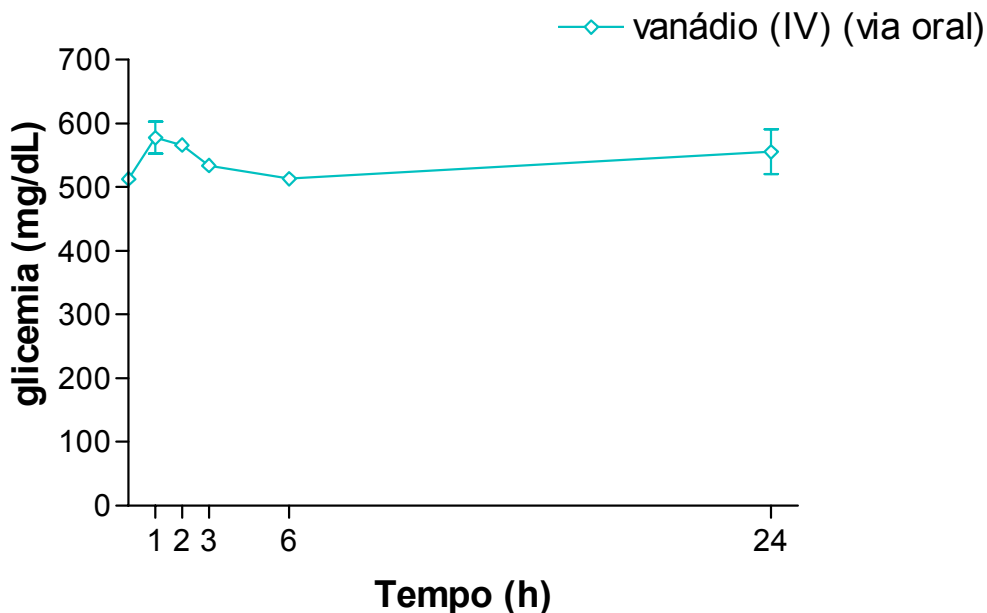


Figura 30. Efeito agudo do vanádio (IV) na dose de 0,0607 mol/L (ou 0,0146 mmol), via oral, em ratos diabéticos. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n = 6 para cada grupo).

Este resultado pode ser atribuído a fatores como: 1) a dose utilizada foi muito baixa quando comparada com doses usadas por outros autores, 2) o limiar de absorção do vanádio por via oral é muito baixo (BRICHARD; HENQUIN, 1995; YUEN et al., 1997) ou 3) possibilidade do vanádio absorvido ter se ligado fortemente a proteínas plasmáticas (WILLSKY et al., 2001) já que a maioria dos metais não se encontram livres na circulação sangüínea e sim complexados com proteínas, o que facilita o transporte e a captação destes metais para as células.

Heyliger em 1985 demonstrou que ratos diabéticos quando tratados oralmente com vanadato tinham os níveis de glicose sangüínea reduzidos a valores normais dentro de 2 a 5 dias. O metavanadato de sódio na água de beber demonstrou ação ótima em 0,2 mg/mL e em alguns animais a normoglicemia persistiu após o término da terapia com vanádio (HEYLIGER et al., 1985).

Ainda, segundo Thompson e colaboradores (1993) o vanádio(IV), na forma de sulfato de vanádio, apresentou uma diminuição na glicemia de ratos diabéticos

quando administrado na água de beber (0,5 a 1,2 g/L) por um período de 8 a 12 semanas (THOMPSON et al., 1993). Por outro lado, estudos feitos por Yuen e colaboradores (1997) demonstraram que o sulfato de vanadila (0,55 mmol/kg) não apresentou efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos quando administrado por via oral durante tratamento agudo (0 a 25 horas).

Como já citado, fatores importantes para os efeitos do vanádio quando administrado por via oral são a absorção e distribuição dos compostos de vanádio que dependem da rota de entrada e da solubilidade dos mesmos nos fluidos corporais (WHO, 1988). As doses orais podem variar consideravelmente por causa da biodisponibilidade extremamente baixa da maioria dos sais de vanádio. Vários relatos demonstram que esses compostos são precariamente absorvidos (no máximo 10%) no trato gastrointestinal (BRICHARD; HENQUIN, 1995; YUEN et al., 1997; WOO et al., 1999; MUKHERJEE et al., 2004) sendo que somente 0,1 a 1% do sal oxitartarovanadato extremamente solúvel é absorvido e 60% dele é excretado via renal em 24 h (WHO, 1988; NRIAGU, 1998).

Mountain em 1959, relatou em estudo não publicado no qual o sulfato de vanadila foi administrado na alimentação a ratos em doses diárias entre 650 a 1250 µg (160 a 310 µg de vanádio) que a absorção média do composto foi de 0,5%, sendo que a duração do ensaio não foi determinada (WHO, 1988). Tendo em vista os resultados contraditórios existentes sobre os efeitos do vanádio quando administrado por via oral e a baixa taxa de absorção dos sais deste metal, a via intraperitoneal apresenta vantagens para o vanádio. Da mesma forma, é vantajoso para os complexos de vanádio a entrada direta na corrente sangüínea, sem passar pelo pH ácido do estômago e sem o risco de serem excretados ao invés de serem absorvidos.

A figura 31 mostra os efeitos da administração por via intraperitoneal da dose 0,0146 mmol de vanádio (IV) em ratos diabéticos. A dose de vanádio (IV) foi escolhida para permitir comparação posterior com o efeito hipoglicêmico dos

complexos canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 e canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) 1:1.

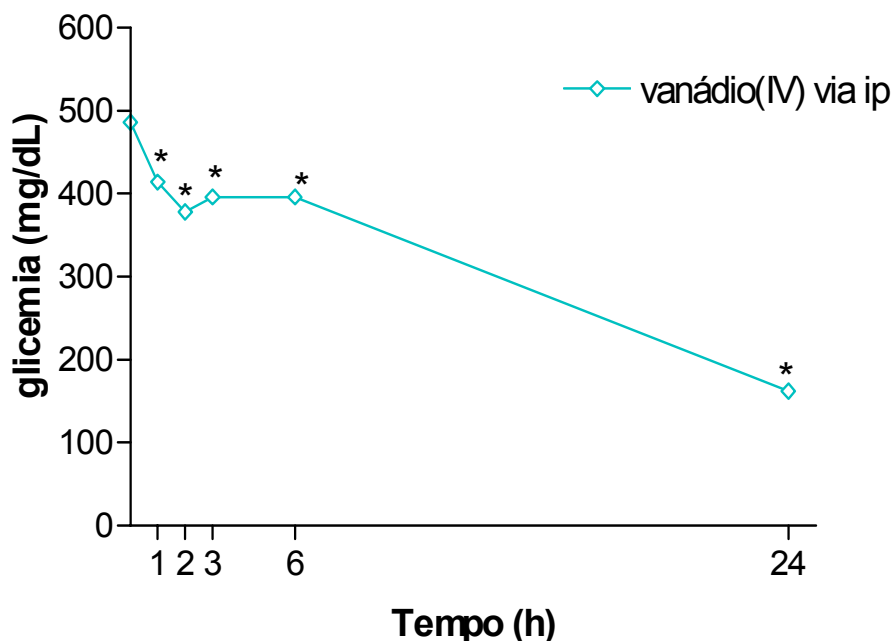


Figura 31. Efeito agudo do vanádio (IV) 0,0607 mol/L (ou 0,0146 mmol), via intraperitoneal, em ratos diabéticos. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas ( $n = 6$  para cada grupo); \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado no tempo zero.

O vanádio(IV) quando administrado por via intraperitoneal apresenta um efeito hipoglicêmico marcante durante todo o tempo estudado. Esta dose de vanádio(IV) apresenta atividade hipoglicemiante máxima de 22% após 2 horas de tratamento, mantendo-se até as 6 horas após o tratamento. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Sakurai e colaboradores (1998), Tsuji e colaboradores (1996). Tsuji demonstrou que o vanádio(IV) (10 mg/kg) administrado intraperitonealmente reduziu a glicemia de ratos diabéticos durante um tratamento de 15 dias e melhorou parcialmente os níveis de insulina plasmática. Sakurai et al em 1998, mostraram que ratos diabéticos tratados com injeções diárias de sulfato de vanadila apresentaram considerável redução nos

níveis glicêmicos e manutenção dos níveis diminuídos de insulina plasmática, sugerindo que o composto possua uma ação periférica.

Segundo Willsky e colaboradores (2001) o sulfato de vanadila (0,1 mmol/kg) administrado intraperitoneal durante um tratamento agudo (72 horas) não apresentou redução na glicemia de ratos diabéticos. Yuen e colaboradores (1997), demonstraram que o sulfato de vanadila (0,55 mmol/kg) não apresentou efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos quando administrado intraperitonealmente durante o tratamento agudo (0 a 25 horas).

Ainda que vários estudos com o vanádio (IV e V) estejam disponíveis na literatura, o mecanismo de ação *in vivo* permanece incerto. Sabe-se que nos dois modelos experimentais de diabetes (tipo I e tipo II) o vanádio diminui a glicemia sem alterar os níveis de insulina, indicando que o local de ação está nos tecidos alvos da insulina. Vários mecanismos são propostos para os efeitos hipoglicemiantes do vanádio: 1) modulação de várias enzimas do metabolismo da glicose incluindo a 6-fosfofrutoquinase, glicoquinase e frutose 2,6-bisfosfatase, 2) ativação e auto-fosforilação do receptor de insulina, estimulando a atividade de tirosina quinase da subunidade  $\beta$  do receptor; 3) inibição de fosfoproteínas tirosina fosfatases (MUKHERJEE et al., 2004); 4) ativação de proteínas tirosina quinase não receptor (GOLDWASER et al., 2000 a, b); 5) estimulação do  $V_{m\acute{a}x}$  do transportador de glicose bem como a síntese da proteína transportadora de glicose (BRICHARD; HENQUIN, 1995; MUKHERJEE et al., 2004).

### **5.5.2 Efeito dos Complexos Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 e Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) 1:1 por Via Oral**

Os compostos de vanádio são conhecidos pelas propriedades insulino-miméticas *in vitro* e *in vivo* (HEYLIGER et al., 1985; THOMPSON et al., 1993;

BRICHARD; HENQUIN, 1995; MUKHERJEE et al., 2004). Desde o primeiro relato das propriedades insulino-miméticas dos sais de vanádio *in vivo* (HEYLIGER et al., 1985), há um interesse crescente na busca do entendimento do papel fisiológico normal do vanádio e também no desenvolvimento de novos compostos ativos de vanádio como alternativas potenciais à insulina no tratamento do diabetes (WOO et al., 1999).

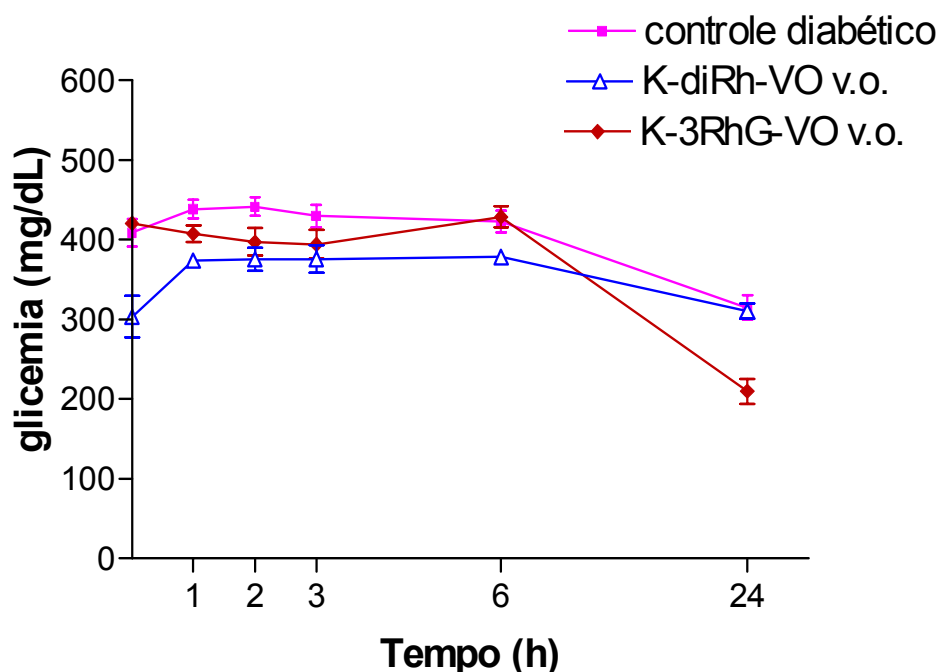


Figura 32. Efeito agudo do complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 administrado por via oral nas doses de 0,0294 mmol e do complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO(IV) 1:1 0,0286 mmol (100 mg/kg) em ratos diabéticos. Os resultados são a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas ( $n = 6$  para cada grupo).

Entendendo a importância da pesquisa por novos ligantes e apoiados nos estudos anteriores e nos resultados obtidos na glicemia com os flavonóides, complexamos o canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e o canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo com o vanádio(IV). A dose de 100 mg/kg dos compostos foi escolhida (para a elaboração das soluções para os estudos de equilíbrio com o vanádio), pois apresentou uma queda de 20,5% e 25,9%,

respectivamente, na glicemia de ratos diabéticos e também utilizando esta dose teríamos um menor consumo dos compostos.

A figura 32 mostra a glicemia após o tratamento agudo do complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 administrado por via oral na dose de 0,0294 mmol (100 mg/kg) e do complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO(IV) 1:1 0,0286 mmol (100 mg/kg) em ratos diabéticos. Como pode ser observado após a administração oral dos compostos estes não apresentaram efeito hipoglicemiante durante o período de 1 a 24 horas de tratamento. Chamamos a atenção que a figura 30 teve por objetivo mostrar o efeito *per se* do vanádio livre na glicemia de ratos diabéticos pela via oral. A dose que usamos naquela figura foi a que tomamos como base para os estudos de equilíbrio dos complexos com os compostos naturais.

Cabe ressaltar que as ações do vanádio livre ou de isômeros deste metal (geralmente sintéticos) na glicemia de ratos quase sempre mostraram efeito hipoglicemiante em doses pelo menos 10 vezes mais altas e por períodos bem mais longos de tratamento. Ainda salientamos que nosso objetivo neste trabalho foi melhorar a atividade hipoglicemiante do composto natural utilizando um metal com conhecido efeito modulador no receptor de insulina sem, no entanto sobrecarregar a célula de um agente com características tóxicas quando usado em altas doses (ver seção introdução, item 1.2.2). Também, a via de administração, mais rápida e eficaz, é importante na elucidação do efeito biológico do complexo como um todo.

Conforme descrito na literatura, a absorção e a incorporação dos sais inorgânicos de vanádio geralmente é muito baixa e a dose necessária para observar algum efeito biológico é próxima aos níveis tóxicos do metal (YUEN et al., 1997; SAKURAI et al., 2002). Dessa forma, numerosos agentes estão sendo investigados como candidatos à complexação com o vanádio, evidenciando que qualquer manipulação que eleve a eficácia insulino-mimética deste metal sem

aumentar a toxicidade é significativa para o tratamento antidiabético (BRICHARD; HENQUIN, 1995; YUEN et al., 1997; NRIAGU, 1998; GOLDWASER et al., 2000a; SHECHTER et al., 2003; THOMPSON et al., 2004).

Estudos feitos por Yuen e colaboradores (1997) demonstraram que os complexos de vanádio(IV)  $\text{VO}(\text{ma})_2$ , e  $\text{VO}(\text{ka})_2$  (0,55 mmol/kg) quando administrados por via oral durante tratamento agudo (0 a 25 horas) em ratos diabéticos, apresentaram efeito hipoglicêmico marcante até 12 horas após o tratamento. O efeito hipoglicêmico do  $\text{VO}(\text{ma})_2$  se prolongou até 24 horas após o tratamento. Estes estudos mostraram também que o sulfato de vanadila (0,55 mmol/kg) administrado oralmente não apresentou efeito hipoglicêmico durante este período de tratamento. Estes resultados evidenciam que os complexos são mais potentes do que o vanádio(IV) livre neste protocolo experimental.

Segundo Woo e colaboradores (1999) os complexos, bis(maltolato)oxovanádio(IV) (BMOV) (0,60 mmol/kg) e o  $\text{VO}(\text{metf})_2$ , (0,60 mmol/kg), demonstraram efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos quando administrados oralmente durante um tratamento agudo (72 horas).

Estudos feitos por Debbie C.Crans (2000) demonstraram que o  $\text{VOSO}_4$  (26 mg/kg) e os complexos de vanádio(IV) tais como:  $\text{VO}(\text{acac})_2$  (13 mg/kg),  $\text{VO}(\text{Et-acac})_2$  (17 mg/kg) e  $\text{VO}(\text{malto})_2$  (18 mg/kg) administrados na água de beber apresentaram diminuição na glicemia de ratos diabéticos tratados por 12 semanas. No entanto os complexos  $\text{VO}(\text{acac})_2$  e  $\text{VO}(\text{Et-acac})_2$  foram tão efetivos em diminuir a glicemia quanto o  $\text{VO}(\text{malto})_2$  e os três complexos foram mais efetivos que o  $\text{VOSO}_4$ . Segundo Sakurai e colaboradores (1998) o complexo bis(pirrolidina-N-ditiocarbonato) oxovanádio(IV) ( $\text{VO}(\text{PYD})$ ) (196  $\mu\text{mol/kg}$ ) foi efetivo em diminuir a glicemia de ratos diabéticos durante 12 dias de tratamento.

Com base nas curvas de distribuição das espécies, podemos dizer que em pH ácido que é o caso do estômago, não há formação de complexo e durante a

passagem pelo trato gastrointestinal poderiam ocorrer modificações nas cargas dos complexos, o que afetaria a absorção e a biodisponibilidade dos mesmos. Porém, estudos farmacocinéticos detalhados da absorção do vanádio, assim como dos níveis séricos dos complexos canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) e canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO(IV) e das interações com proteínas e ligantes plasmáticos merecem investigações adicionais. Com os resultados obtidos, podemos supor que a ausência de efeito de ambos os complexos possa também ser devida a dosagem utilizada, que é baixa quando comparada às dosagens de diferentes compostos utilizadas por outros autores. Além disso, fatores como agentes quelantes, dieta, idade, linhagem dos animais, estresse e severidade da doença (NRIAGU, 1998; WILLISKY et al., 2001) poderiam estar influenciando a absorção dos complexos no trato gastrointestinal.

### **5.5.3 Efeito dos Complexos Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 e Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) 1:1 por Via Intraperitoneal**

A figura 33 mostra o efeito agudo da administração intraperitoneal da dose de 0,0294 mmol (100 mg/kg) do complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) em ratos diabéticos. O complexo apresentou efeito hipoglicêmico durante todo o tempo estudado. As quedas máximas na glicemia são de 17,8% nas 3 horas e 25% após 6 horas de tratamento, prolongando esse efeito até as 24 horas (60,7%). Quando comparado ao vanádio, que possui atividade máxima na 2ª hora de 22,2% em relação ao tempo zero, na 6ª hora de 18,5% e nas 24 horas de 66,6%, podemos afirmar que o complexo foi tão efetivo quanto o vanádio livre, neste modelo experimental.



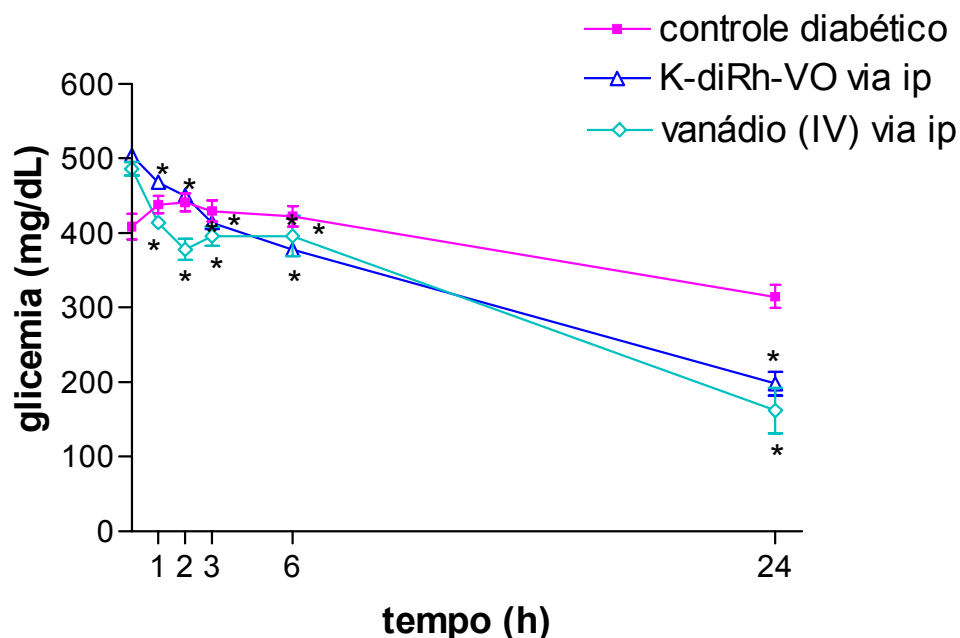


Figura 33. Efeito agudo do complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 administrado por via intraperitoneal na dose de 100 mg/kg (0,0294 mmol) e da solução de vanádio (IV) (0,0146 mmol) em ratos diabéticos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n= 5). \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado no tempo zero.

Estudos realizados por Yuen e colaboradores (1997) demonstraram que o sulfato de vanádio(IV) (0,06 mmol/kg) e o complexo  $[\text{VO}(\text{ma})_2]^-$  (0,06 mmol/kg) não apresentaram efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos quando administrados intraperitonealmente durante tratamento agudo (0 a 25 horas). Os complexos,  $\text{VO}(\text{ma})_2$ , e  $\text{VO}(\text{ka})_2$  (0,06 mmol/kg), apresentaram redução na glicemia após 2 horas de tratamento e esta diminuição se prolongou até 12 horas de tratamento. Estes resultados sugerem que o complexo neutro, no caso, o BMOV, é mais potente que o produto oxidado ( $[\text{VO}(\text{ma})_2]^-$ ), o análogo ( $\text{VO}(\text{ka})_2$ ) e o vanádio (IV) por facilitar a entrada do complexo neutro nas células.

Segundo Sakurai e colaboradores (1998) o complexo ditiocarbonato-vanadil ( $\text{VO-PYD}$ ) (198  $\mu\text{mol/kg}$ ) apresentou efeito hipoglicêmico melhor quando administrado por via intraperitoneal do que quando administrado oralmente e

sugeriu que o tipo de coordenação  $VO(S_4)$  poderia servir como modelo para um provável agente hipoglicemiante.

Segundo Willsky e colaboradores (2001) quando o complexo de bismaltolato oxovanádio(IV), (BMOV) e o sulfato de vanadila foram administrados intraperitonealmente durante um tratamento agudo, apenas o complexo apresentou uma redução na glicemia de ratos diabéticos. O autor sugeriu que possivelmente o sal de vanádio tenha se ligado rapidamente com as proteínas do plasma e a ligação formada entre o vanádio e a proteína fosse tão forte que o vanádio não estivesse disponível para a função biológica. Dessa forma, isso indica que a ligação do vanádio com componentes do plasma como proteínas pode afetar a disponibilidade do composto. Assim sendo, se o ligante for adequado para complexação e administração do vanádio pode-se diminuir a formação de complexos com outros ligantes circulantes, deste modo aumentando-se a biodisponibilidade do vanádio no plasma.

Segundo a literatura, os complexos de vanádio ativos deveriam gerar espécies estáveis e com sítios de coordenação livre em pH fisiológico para que pudessem se ligar a estruturas celulares como receptores, transportadores de glicose e outras enzimas. Os estudos de equilíbrio mostram uma espécie ativa,  $VOH_2L_2$ , em pH fisiológico conforme a figura 25. Analisando a estrutura proposta desta espécie, podemos supor que a presença de dois ligantes (K-diRh) relativamente grandes, pode diminuir a atividade do vanádio, uma vez que este se encontra com os sítios de coordenação comprometidos no complexo. Ainda, a atividade hipoglicemiante do complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) poderia ser creditada às hidroxilas livres equidistantes nos anéis B dos ligantes, já que conforme a figura 21A, o K-diRh administrado por via intraperitoneal apresentou atividade máxima de 20,3% após 3 horas de tratamento, semelhante à do complexo mostrado na figura 33.

Segundo Woo e colaboradores (1999), os complexos BMOV e VO(metf)<sub>2</sub> administrados na dose de 0,12 mmol/kg por via intraperitoneal em ratos diabéticos por um período agudo de tratamento (72 horas) foram efetivos em reduzir a glicemia. Entretanto, o complexo VO(metf)<sub>2</sub> foi tão efetivo quanto o BMOV e nenhum efeito associativo ou sinérgico, devido à presença da biguanida no complexo com vanádio, foi observado. Estes complexos apresentam-se na forma neutra, com maior lipofilia e absorção gastrointestinal. Ainda possuem relação 2:1 e modo de coordenação VO<sub>4</sub> e VN<sub>4</sub> respectivamente. Este modo de coordenação é similar ao do complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) evidenciando que estudos adicionais com relação ao modo de coordenação e absorção do mesmo devem ser realizados na tentativa de esclarecer os mecanismos do efeito hipoglicemiante.

Os efeitos do complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) 1:1 na dose de 0,0286 mmol (100 mg/kg) administrado por via intraperitoneal são apresentados na figura 34.

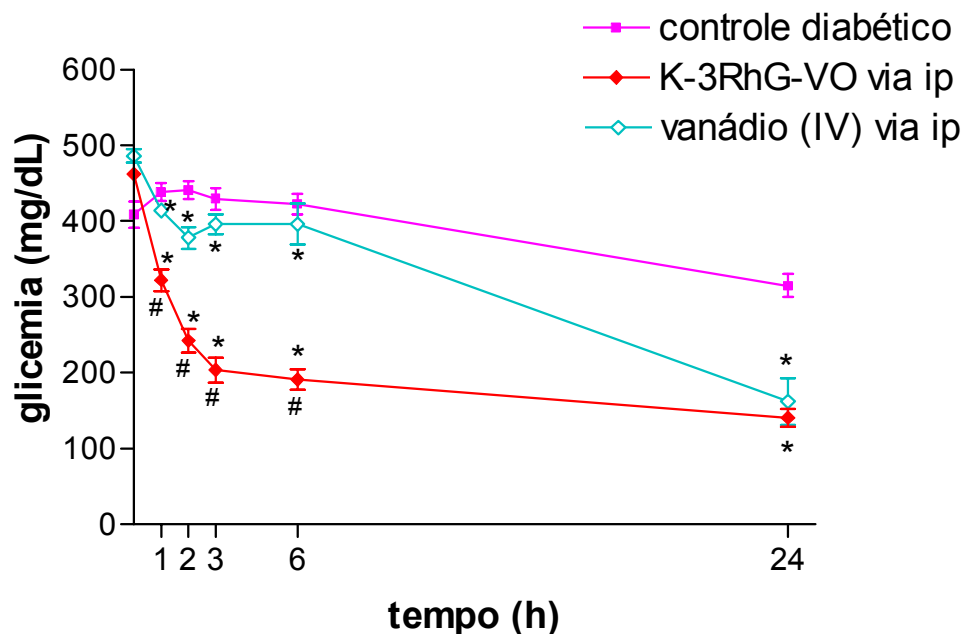


Figura 34. Efeito agudo do complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo – vanádio (IV)1:1 na dose de 100 mg/kg (0,0286 mmol) administrado por via intraperitoneal e da solução de vanádio (IV) (0,0146 mmol) em ratos diabéticos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n= 5). \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao respectivo tempo zero. # - Significativo em relação aos tempos controles do vanádio.

O complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo – vanádio (IV)1:1 apresentou efeito hipoglicemiante durante todo o tempo estudado. O complexo mostrou uma potente atividade de 47,6% na segunda hora de tratamento, 55,9% às 3 horas e uma ação máxima de 58,6% às 6 horas após o tratamento mantendo esse efeito após as 24 horas (69,6% de ação). Quando comparado ao vanádio livre, com atividades de 22,2% na 2ª hora, na 3ª e 6ª hora 18,5% e nas 24 horas 66,5% podemos afirmar que o complexo por via i.p é cerca de 2,5 vezes mais potente que o vanádio para as primeiras 6 horas de tratamento, apresentado uma potência semelhante nas 24 horas. Ainda, comparando o complexo (figura 34) com o canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo livre (figura 23) administrado por via intraperitoneal, com atividade máxima de 25,2% na terceira hora, podemos afirmar que o complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo – vanádio (IV)1:1 foi mais potente que o

composto livre já que a atividade neste mesmo tempo foi aproximadamente duas vezes maior (55,9%) e, além disso, o efeito prolongou-se até as 24 horas enquanto que com o composto livre a glicemia restabeleceu aos níveis basais a partir das 3 horas após o tratamento (figura 23).

Em trabalho recentemente publicado, Shukla e colaboradores (2004) descrevem a síntese e caracterização estrutural de um complexo de vanádio(IV) com a quercetina, um flavonóide amplamente distribuído em plantas. Foi observado que o complexo é eletricamente neutro, possui estequiometria 1:1 e peso molecular 868 Da. A partir das características físico-químicas do complexo, os pesquisadores sugeriram que o oxigênio da carbonila no anel C estivesse envolvido na coordenação com o metal. Além disso, os dados também indicaram que não houve envolvimento das O-hidroxilas do anel B na complexação. Isto leva a suposição que o grupo 3-hidroxil do anel C ou o grupo 5-hidroxil do anel A esteja envolvido na coordenação com o vanádio.

O complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo – vanádio (IV) também apresentou estequiometria 1:1 conforme os resultados dos estudos potenciométricos. A partir dos resultados podemos propor que a interação do metal com o composto ocorra através do oxigênio da carbonila no anel C e além disso, o vanádio também possa interagir com o grupo hidroxila do anel A uma vez que o grupamento 3-hidroxila do anel C encontra-se ligado a uma ramnose. Considerando estes aspectos, esses resultados estão de acordo com o exposto para o complexo de vanádio (IV) com quercetina (SHUKLA et al., 2004). Ainda neste mesmo trabalho, foram estudados o potencial anti-diabético do complexo vanádio (IV)-quercetina em relação a outros compostos. Os compostos (complexo VO(IV)-quercetina, BMOV, sulfato de vanadila(VOSO<sub>4</sub>) e quercetina) foram administrados por via oral na dose de 0,4 mmol/kg em camundongos diabéticos. O complexo de quercetina apresentou efeito máximo até a 21<sup>a</sup> hora após, os níveis de glicose subiram novamente. Na 21<sup>a</sup> hora de tratamento, a redução máxima na glicemia observada entre os compostos foi de 60% para o

complexo com quercetina, 30% para o BMOV, 14% para o  $\text{VOSO}_4$  e 20% para a quercetina demonstrando o potencial papel insulino-mimético do complexo com a quercetina.

Os efeitos observados com o complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo – vanádio (IV) são coerentes com os encontrados para o composto com a quercetina, ainda que existam diferenças quanto a dose, o tipo de flavonóide e até mesmo com o modelo experimental.

#### **5.5.4 Efeito Comparativo dos Complexos Canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) da *B. forficata*, do Canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) da *C. phalerata* com o Vanádio e a Insulina por Via Intraperitoneal na Glicemia de Ratos Diabéticos**

Apoiado nos resultados encontrados para os complexos canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 e canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) 1:1 administrados por via intraperitoneal na glicemia de ratos diabéticos em um período agudo de tratamento (até 24 horas), optamos pelo tempo de 3 horas como tempo ótimo para comparação do potencial hipoglicemiante dos complexos com o vanádio e com a insulina conforme mostra a figura 35.

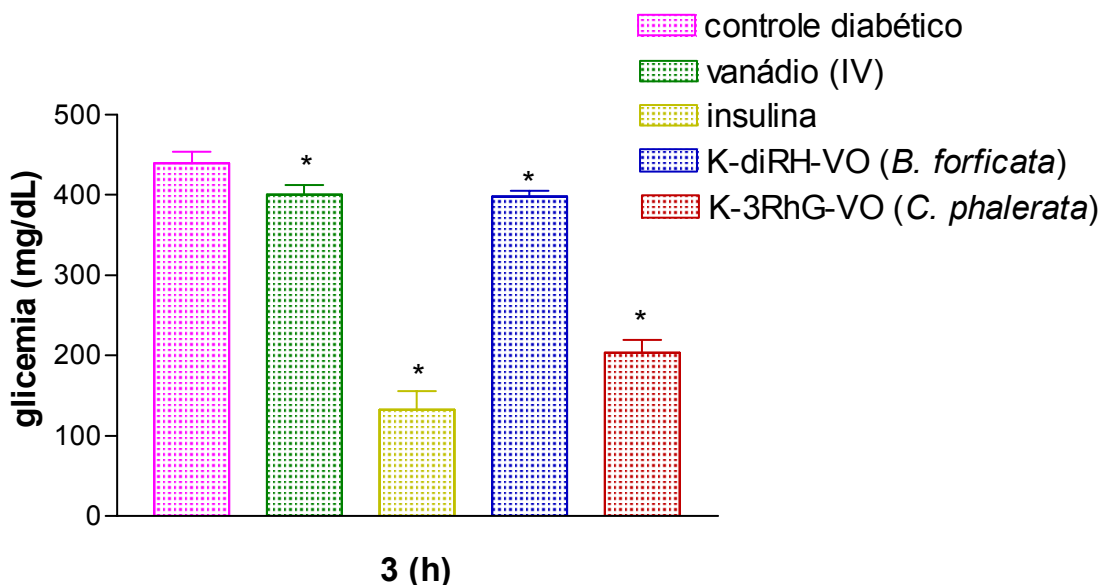


Figura 35. Efeito comparativo dos complexos canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) e canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) com o vanádio (IV) 0,0146 mmol e insulina exógena 0,5 UI por via intraperitoneal em ratos diabéticos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de experimentos realizados em duplicatas (n= 5). \* Significativo para  $p \leq 0,05$  em relação ao controle diabético.

Quando comparado ao grupo controle diabético, todos os compostos apresentaram marcado efeito hipoglicemiante. A insulina na dose 0,5 UI foi a que apresentou melhor efeito (67,5%), já esperado por ser o hormônio responsável pela regulação do metabolismo de carboidratos. Esse resultado é interessante como base para comparar com os demais efeitos observados.

O vanádio (IV) na dose de 0,0146 mmol apresentou, por esta via, 18,5% de queda na glicemia, o que comparado com a insulina representa uma potência de 27,4%. Já o complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 tem 17,8% de atividade hipoglicemiante, por esta via, neste mesmo tempo comprovando que o complexo é tão efetivo quanto o vanádio livre e possui 26% de potência em relação a insulina. Este resultado está de acordo com os de Woo e colaboradores (1999), que demonstrou que o complexo VO(metf)<sub>2</sub> foi tão efetivo quanto o BMOV

na glicemia e nenhum efeito associativo ou sinérgico devido à presença da biguanida no complexo com vanádio foi observado.

Dentre os resultados apresentados na figura 35 o complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) 1:1, preparado e testado em função dos resultados obtidos na glicemia de animais diabéticos tratados com o composto canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo e com o complexo de canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1, foi o que apresentou melhores efeitos (56% de atividade) tanto comparado a insulina (83% de potência) quanto comparado ao vanádio, sendo neste tempo cerca de 3 vezes mais efetivo que este último.

Ainda, comparando o complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo- VO(IV) 1:1 com o canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1, a ação hipoglicemiante do complexo do flavonóide glicosilado proveniente da *C. phalerata* foi 3 vezes mais potente. Essa maior atividade pode ser devida a estequiometria do complexo ou seja, uma relação 1:1. Dessa forma, o íon vanádio coordenado somente com um ligante permanece com sítios de coordenação livres para interagir com componentes celulares como proteínas e enzimas.

Além disso, a presença do grupo 7-OH (hidroxila) livre no anel A também pode influenciar para a melhor atividade do complexo, já que a inserção de grupos doadores de elétrons como os radicais metil ou hidroxil, ou grupos aceptores de elétrons como os halogênios à estrutura do complexo é um método útil para desenvolver compostos de vanádio insulino-miméticos mais ativos (SAKURAI et al., 2002). Além disso, o potencial antioxidante dos flavonóides já bem caracterizado é uma vantagem adicional no caso dos complexos presentes (SAIJA et al., 1995; ZARZUELO et al., 1996; PIETTA, 2000; VESSAL et al., 2003; DE SOUSA et al., 2004).



Atualmente, existem vários estudos a respeito das ações insulino-miméticas e da caracterização estrutural dos compostos de vanádio embora pouco é conhecido com relação às espécies ativas, sítios e mecanismos de ação (CRANS, 2000). Os compostos de vanádio em geral produzem os efeitos insulino-miméticos através: 1) da inibição de proteínas tirosina fosfatases, 2) atuando no receptor de insulina e/ou em pontos distantes do receptor na via de sinalização da insulina, 3) na translocação e/ou ativação dos transportadores de glicose GLUT4 (CRANS, 2000). O BMOV, por exemplo, complexo de coordenação  $V(O_4)$ , já demonstrou ser um potente inibidor de fosfotirosina fosfatases (YUEN et al., 1997).

De acordo com a literatura, os efeitos anti-hiperglicêmicos dos complexos de vanádio, poderiam ser atribuídos a interação e ativação pelos complexos de proteínas tirosina cinases não receptor (SHISHEVA; SHECHTER, 1991,1993a; GOLDWASER et al., 2000b) ou a inibição de proteínas tirosina fosfatases. Além disso, os complexos poderiam atuar em nível dos transportadores de glicose, aumentando a translocação e/ou a ativação dos mesmos e dessa forma aumentar a captação de glicose para dentro das células. Também poderiam estar envolvidos diretamente com o receptor de insulina e processos de fosforilação na cascata de sinalização do hormônio.

## 6 CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- O modelo experimental induzido com aloxana caracterizou o estado diabético.
- A insulina administrada por via intraperitoneal foi efetiva em reduzir a glicemia de animais normais hiperglicêmicos e animais diabéticos neste modelo experimental.
- Foi caracterizada uma curva de tolerância à glicose oral típica em ratos normais na presença ou não de insulina.
- O canferol isolado das folhas da *B. forficata* não reduziu os níveis glicêmicos de animais diabéticos em nenhuma das doses e tempos estudados.
- A quercetina na dose de 100 mg/kg por via oral apresentou ligeiro efeito hipoglicemiante em animais diabéticos.
- O canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo reduziu significativamente a glicemia em ratos diabético num período agudo (0 –24 horas) de tratamento por via intraperitoneal.

- O canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo reduziu significativamente a glicemia em ratos diabéticos tratados por um período agudo (0 – 3 horas) por via oral e por via intraperitoneal (0 – 24 horas) nas doses de 50 e 100 mg/kg sendo as duas vias igualmente efetivas.
- Os compostos canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo e canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo quando administrados por via intraperitoneal por um período de 24 horas, apresentaram 37,3% e 30,2%, respectivamente, de potência comparados à ação da insulina (considerada 100%) na terceira hora após o tratamento.
- O estudo potenciométrico do sistema canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 revelou que ocorrem interações entre o vanádio (IV) e o canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo formando a espécie predominante (em torno de 95%)  $\text{VOH}_2\text{L}_2$  em pH fisiológico.
- A espécie  $\text{VOH}_2\text{L}_2$  apresentou efeito hipoglicêmico quando administrada intraperitonealmente em ratos diabéticos. Este complexo foi tão efetivo quanto o vanádio (IV) livre e possui cerca de 26% de potência em relação à insulina no mesmo período ( 3 horas após o tratamento).
- O estudo dos equilíbrios de complexação do sistema canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO(IV) 1:1 mostrou que em pH fisiológico as interações entre o flavonóide e o metal originam a espécie predominante (em torno de 75%) VOHL (monoprotonada).
- O complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO(IV) 1:1 apresentou efeito hipoglicemiante quando administrado por via intraperitoneal em ratos diabéticos em período agudo (0 – 24 horas). Este complexo foi cerca de 2,5 vezes mais potente que o vanádio (IV) livre, 2

vezes mais potente que o composto livre e cerca de 3 vezes mais potente que o complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1.

- Ambos os complexos, canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) e canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO(IV) apresentaram atividade hipoglicemiante significativa durante os períodos estudados. O complexo do flavonóide da *Cyathea phalerata* apresentou melhores resultados devido, provavelmente, à estrutura do complexo com relação estequiométrica 1:1. Quando comparada à estrutura do complexo canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) que possui estequiometria 2:1, o complexo da *C. phalerata* apresentou sítios de coordenação do íon vanádio potencialmente livres, uma vez que há somente um ligante coordenado ao íon metálico.
- Analisando-se as glicemias obtidas a partir dos diferentes tratamentos e vias com os compostos canferol, quercetina, canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo e canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo podemos concluir que a presença e a posição dos açúcares unidos à estrutura flavonoídica básica são essenciais para a atividade hipoglicemiante observada.
- Comparando-se a atividade dos complexos com a insulina, o complexo canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO(IV) foi o que apresentou melhor efeito (cerca de 83% de biopotência).

## 7 PERSPECTIVAS

Considerando que o canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo é efetivo como agente hipoglicemiante e o canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo também apresentou ações hipoglicêmicas significativas, os objetivos do grupo são estudar os efeitos dos complexos (canferol-3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo-VO(IV) 2:1 e canferol 3-O-( $\alpha$ )-L-ramnopiranosil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo-VO(IV) 1:1) na captação de glicose no músculo sóleo de ratos (determinação do  $K_m$  e  $V_{máx}$ ), bem como, investigar o mecanismo de ação destes complexos de vanádio na via de sinalização da insulina através da interferência de fármacos nesta via. Também, temos como objetivos estudar estes flavonóides glicosilados e outros (de outras plantas e/ou de outras frações) na atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (glicogênio sintase; hexoquinase; glicoquinase; etc) em tecidos insulino-sensíveis.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BARRY, J.A.; ABDEL-HASSAN, I.A.; AL-HAKIEM, M.H.H. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 58, p. 149-155, 1997.

ALARCÓN-AGUILAR, F.J.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R.; ROMAN-RAMOS, R. Hypoglycaemic effect of extracts and fractions from *Psidium* decompositum in healthy and alloxan-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 21-27, 2000.

ARAI, Y.; HIROHARA, M.; MATSUHIRA, M.; TOYOSAKI, K.; AGETA, H. Fern constituents: Triterpenoids isolated from leaflets of *Cyathea lepifera*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 43, (11), p. 1849-1852, 1995.

ARAI, Y.; KOIDE, N.; OHKI, F.; AGETA, H.; YANG, L.L.; YEN, K.Y. Fern constituents: Triterpenoids isolated from leaflets of *Cyathea spinulosa*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 42 (2), p. 228-232, 1994.

BANTING, F.G.; BEST, C.H.; COLLIP, J.B.; CAMPBELL, W.R.; FLETCHER, A.A. 1922 In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 8ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

BARAN, E. Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 80, p. 1-10, 2000.

BEARDSALL, K.; YUEN, K.; WILLIAMS, R.; DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. *Current Paediatrics*, v. 13, p. 543-548, 2003.

BECKER, D.J.; ONGEMBA, L.N.; HENQUIN, J.C. Comparison of the effects of various vanadium salts on glucose homeostasis in streptozotocin-diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 260, 169-175, 1994.

- BOSCH, F.; HATZOGLU, M.; PARK, E.A.; HANSON, R.W. Vanadate inhibits expression of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat hepatoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, p. 13677-13682, 1990.
- BRELJE, T.C.; SORENSON, R.L. Nutrient and hormonal regulation of the threshold of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreases. *Endocrinology*, v. 123, p. 1582-1590, 1988.
- BRICHARD, S.M.; HENQUIN, J.C.; The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends in Pharmacological Sciences*. v. 16, p.265-269, 1995.
- BRINGMANN, G.; GÜNTHER, C.; JUMBAM, D.N. Isolation of 4-O- $\beta$ -glucopyranosylcaffeic acid and gallic acid from *Cyathea dregei* Kunze (Cyatheaceae). *Pharmaceutical Pharmacological Letters*, v. 9, (2), p. 41-43, 1999.
- BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. (Eds). Tietz Fundamentos de Química Clínica. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- CANTLEY, L.C. Jr.; JOSEPHSON, L.; WARNER, R.; YANAGISAWA, M.; LECHENE, M.; GUIDOTTI, G. Vanadate is a potent (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *Journal of Biological Chemistry*, v. 242, p. 7421-7423, 1977.
- CARICATI-NETO, A.; PEREIRA, O.C.M.; BASTOS-RAMOS, W.P. Effects of the aqueous and alcoholic extracts of *Bauhinia forficata* on blood glucose in the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.18, p. 726A, 1985.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, (1), 1998.
- CLARKE, E.; MARTELL, A.E. Potentiometric and Spectrophotometric Determination of Stabilities of In (III), Ga(III) and Fe(III) Complexes of N,N',N''-tris-(3,5-dimethyl-2-hydroxybenzyl)-1,4,7-triazacyclononane. *Inorganica Chimica Acta*, v. 186, p. 103-111, 1991.

COSTA, O.A. Plantas hipoglicemiantes Brasileiras. Rio de Janeiro, Ed. Leandra, 1975.

CRANS, D. Chemistry and insulin-like properties of vanadium (IV) and vanadium (V) compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 80, p. 123-131, 2000.

CUNHA, P.; VERDI, L.G.; PIZZOLATTI, M.G.; MONACHE, F.D. Estudo fitoquímico da *Cyathea phalerata*. In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003, Poços de Caldas, Brasil. Anais da (...) 2003, v. 1, p. 122-122.

DA SILVA, K.L.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). *Zeitschrift Naturforschung*, v.55, p. 478-480, 2000.

DA SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, v.25, p. 449-454, 2002.

DAMASCENO, D.C.; VOLPATO, G.T.; TRABALLI, A.L.M.; SILVA, C.F.; OLIVEIRA, M. Effect of *Bauhinia forficata* alcoholic extract on streptozotocin-induced diabetic rats In: XVI Latinamerican Congress of Pharmacology/ II Iberoamerican Congress of Pharmacology, 2000, Campinas, Brasil.

DAVIS, S.N.; GRANNER, D.K. Insulina, fármacos hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 8ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

DE SOUSA, E. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade hipoglicêmica da espécie vegetal *Bauhinia forficata* Link. 2002. Dissertação de mestrado em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

DE SOUSA, E. Obtenção de flavonóides glicosilados para estudos de complexação com metais e avaliação da atividade hipoglicêmica de *Bauhinia forficata*. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Santa Catarina.



DE SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.M.B. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *Journal of Natural Products*, v. 67, (5), p. 829-832, 2004.

FISCHER, L. Drugs and chemicals that produce diabetes. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 6, p.72-75, 1985.

FURNAN, N. Standard methods of chemical analysis vol, 1. D. Van Nostrand Company Inc., 1211-1213, 1962.

GADSBY, R. Epidemiology of diabetes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 1165 – 1172, 2002.

GARCIA, J.A.G. Una semblanza de la química bioinorgánica del vanadio. *Educación Química*, v. 7, (04), p. 185-189, 1996.

GÖKE, B. Implications of blood glucose, insulin resistance and  $\beta$ -cell function in impaired glucose tolerance. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 40 ( suppl), p. S15-S20, 1998.

GOLDWASER, I.; GEFEL, D.; GERSHONOV, E.; FRIDKIN, M.; SHECHTER, Y. Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 80, p. 21-25, 2000b.

GOLDWASER, I.; QIAN, S.; GERSHONOV, E.; FRIDKIN, M.; SHECHTER, Y. Organic vanadium chelators potentiate vanadium-evoked glucose metabolism in vitro and in vivo: establishing criteria for optimal chelators. *Molecular Pharmacology*, v. 58, (04), p. 738-746, 2000a.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

HARADA, T.; SAIKI, Y. 1955 In: HIRAOKA, A.; HASEGAWA, M. Flavonoid glycosides from five *Cyathia* species. *Bot. Mag. Tokio*, v. 88, p. 127-130, 1975.

HEI, Y.J. Recent progress in insulin signal transduction. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 40, p. 123-135, 1998.

HEYLIGER, C.E.; TAHILIANI, A.G.; McNEILL, J.H. Effect of vanadato on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science*, v. 227, p. 1474-1476, 1985.

HIRAOKA, A.; HASEGAWA, M. Flavonoid glycosides from five *Cyathea* species. *Bot. Mag. Tokio*, v. 88, p. 127-130, 1975.

HIRAOKA, A.; MAEDA, M.; A new acylated flavonol glycoside from *Cyathea contaminans* Copel. And its distribution in the Pterophyta. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 27 (12), p. 3130-3136, 1979.

INZUCCHI, S.E. Oral Antihyperglycemic Therapy for Type 2 Diabetes. *Journal of the American Medical Association*, v. 287, (3), p. 360-370, 2002.

ISLAS-ANDRADE, S.; MONSALVE, M.C.R.; DE LA PEÑA, J.E.; POLANCO, A.C.; PAMOLINO, M.A.; VELASCO, A.F. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. *Acta Histochemistry Citochemistry*, v. 33, (3), p. 201-208, 2000.

JAFRI, M.A.; ASLAM, M.; JAVED, K.; SINGH, S. Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 70, p. 309-314, 2000.

JAOUHARI, J.T.; LAZREK, H.B.; JANA, M. The hypoglycaemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hyperglycaemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, p. 17-20, 2000.

JORGE, A.P. Efeito insulino-mimético do canferol 3,7-O-( $\alpha$ )-L-diramnosídeo na glicemia e na captação da 2-[ $^{14}$ C (U)]-deoxi-D-glicose em músculo sóleo de ratos. 2003. Dissertação de mestrado em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

JORGE, A.P.; HORST, H.; DE SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on  $^{14}$ C-glucose uptake in rat soleus muscle. *Chemico-Biological Interactions*, v. 149, p. 89-96, 2004.

JOY, K.L.; KUTTAN, R. Anti-diabetic activity of Picrorrhiza kurroa extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 167, p. 143-148, 1999.

JULIANI, C. Ação hipoglicemiante da Unha-de-Vaca. *Revista Médica Farmacologia, Química e Fisiologia*, v. 2, p.165-169, 1929.

JULIANI, C.; Ação hipoglicemiante da Bauhinia forficata Link – novos estudos experimentais. *Revista Sudamericana de Endocrinologia, Immunologia e Quimioterapia*, v.14, p. 326-334, 1931.

JULIANI, C.; Ação hipoglicemiante da Bauhinia forficata Link – Novos estudos clínicos e experimentais. *Jornal dos Clínicos*, v.3, p. 93-112, 1941.

KASLAUSKAITE, R.; FOGELFELD, L. Insulin therapy in type 2 diabetes. *Disease-a- Month*, v. 49, p. 377-420, 2003.

KLOVER, P.J.; MOONEY, R.A. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. The International. *Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 34, p. 753-758, 2004.

LE FLEM, G.; DUPRADEAU, F.Y.; PUJOL, J.P.; MONTI, J.P.; BOGDANOWICZ, P. Synthesis, and functional properties of a modified human insulin A-chain: implication in a “mini-insulin” structure determination. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 10, p. 2111-2117, 2002.

LEROITH, D.  $\beta$ -Cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *American Journal of Medicine*, v. 113, (6A), p. 3S-11S, 2002.

LINO, C.S.; DIÓGENES, J.P.; PEREIRA, B.A.; FARIA, R.A.; ANDRADE NETO, A.; ALVES, R.S.; DE QUEIROZ, M.G.; DE SOUSA, F.C.; VIANA, G.S. Antidiabetic activity of Bauhinia forficata extracts in alloxan-diabetic rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, (1), p. 125-127, 2004.

MARLES, R.J.; FARNSWORTH, N.R. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, v. 2, p. 117-189, 1995.

MARTELL, A.E.; MOTEIKAITS, R.J. The determination and use of stability constants, 2<sup>nd</sup> ed. New York: VCH publishers, 1992.

MARTINS, R.E.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. Plantas Medicinais. Editora UFV: Viçosa, p.155, 1998.

MILRAPEIX, M.; DECAUX, J.F.; KAHN, A.; BARTRONS, R. Vanadate induction of L-type pyruvate kinase mRNA in adult rat Hepatocytes in primary culture. *Diabetes*, v. 40, p. 462-464, 1991.

MOORE, M.C.; CHERRINGTON, A.D.; WASSERMAN, D. H. Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 17, p. 343-364, 2003.

MUKHERJEE, B.; PATRA, B.; MAHAPATRA, S.; BANERJEE, P.; TIWARI, A.; CHATTERJEE, M. Vanadium – an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, v. 150, p. 135-143, 2004.

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 417, p. 12-17, 2003.

NECHAY, B.R. Mechanism of action of vanadium. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 24, p. 501-524, 1984.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. Hormones. Second edition. Academic Press, 1997.

NORMAN, A.W.; OLIVEIRA, C.J.; SILVA, F.M.B.; BISHOP, J.E. A specific binding protein/receptor for 1 $\alpha$ , 25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> is present in an intestinal caveolae membrane fraction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 298, p. 414-419, 2002.

NRIAGU, J.O. (Ed). Vanadium in the Environment: part two – health effects. 1 ed. New York: John Wiley & Sons, 1998. 403p. V. 31.

NURALIEV, I.N.; AVEZOV, G.A. 1992 In: VESSAL M.; HEMMATI, M.; VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 135, parte C, p. 357-364, 2003.

NYSTROM, F.H.; QUON, M.J. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cellular Signalling*, v. 11, p. 563-574, 1999.

OIKININE, R.; MOORADIAN, A.D. Drug therapy of diabetes in the elderly. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 57, p. 231-239, 2003.

ONG, K.C.; KHOO, H. Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transporter translocation. *Biochemical Pharmacology*, v. 51, p. 423-429, 1996.

ONG, K.C.; KHOO, H.E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sciences*, v. 67, p. 1695-1705, 2000.

PAQUET, M.R.; ROMANEK, R.J.; SARGEANT, R.J. Vanadate induces the recruitment of glut-4 glucose transporter to the plasma membrane of rat adipocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 109, p. 149-155, 1992.

PEPATO, M.T.; KELLER, E.H.; BAVIERA, A.M.; KETTELHUT, I.C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I.L. Anti-diabetic activity of Bauhinia forficata decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 191-197, 2002.

PERTSEVA, M.N.; SHPAKOV, A.O.; PLESNEVA, S.A.; KUZNETSOVA, L.A. A novel view on the mechanisms of action of insulin and other insulin superfamily peptides: involvement of adenyli cyclase signaling system. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 134, Part B, p. 11-36, 2003.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Insulin therapies – past, present and future. *Drug Discovery Today*, v. 6, (20), p.1056-1060, 2001.

PIÑERO-PILOÑA, A.; RASKIN, P. Idiopathic Type 1 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*, v. 15, p. 328-335, 2001.

PISKULA, M.K.; TERAQ, J. 1998 In: MUROTA, K.; TERAQ, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 417, p. 12-17, 2003.

PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA JR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de Bauhinia forficata (Leguminosae). *Química Nova*, v. 26, p. 466-469, 2003.

RAO, B. K.; SUDARSHAM, P.R.; RAJASEKHAR, M.D.; NAGARAJU, N.; RAO, A. Ch. Antidiabetic activity of Terminalia pallida fruit in alloxan induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 85, p. 169-172, 2003.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

REHDER, D. Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 6, p. 604-617, 2003.

ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J.M. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *TRENDS in Biochemical Sciences*, v. 26, (5), p. 310-317, 2001.

ROSMALLEN, J.G.M.; LEENEN, P.J.M.; PELEGRI, C.; DREXHAGE, A.; HOMODELARCHE, F. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, v. 13, (5), p.209-213, 2002.

RUSO, E.M.K.; REICHEL, A.A.J.; DE-SÁ, J.R.; FURLANETTO, R.P.; MOISÉS, R.C.S.; KASAMATSU, T.S.; CHACRA, A.R. Clinical trial of Myrcia uniflora and Bauhinia forficata leaf extracts in normal and diabetic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 23, p. 11-20, 1990.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 19, (4), p. 481-486, 1995.

SAKURAI, H.; KOJIMA, Y.; YOSHIKAWA, Y.; KAWABE, K.; YASUI, H. Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 226, p. 187–198, 2002.

SAKURAI, H.; WATANABE, H.; TAMURA, H.; YASUI, H.; MATSUSHITA, R.; TAKADA, J. Insulin-mimetic vanadyl-dithiocarbamate complexes. *Inorganica Chimica Acta*, v. 283, p. 175-183, 1998.

SATTERFIELD, M.; BRODBLET, J.S. Structural characterization of flavonoid glycosides by collisionally activated dissociation of metal complexes. *Metal- ion Interactions*, 2001.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; RÉMÉSY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapeutics*, v. 56, p. 276-282, 2002.

SETYAWATI, I.A.; THOMPSON, K.H.; YUEN, V.G.; SUN, Y.; BATTELL, M.; LYSTER, D.M.; VO, C.; RUTH, T.J.; ZEISLER, S.; McNEILL, J.H.; ORVIG, C. Kinetic analysis and comparison of uptake, distribution, and excretion of  $^{48}\text{V}$ -labeled compounds in rats. *Journal of Applied Physiology*, v. 84, p. 569-575, 1998.

SHECHTER, Y.; GOLDWASER, I.; MIRONCHILK, M.; FRIDKIN, M.; GEFEL, D. Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 237, p. 3-11, 2003.

SHISHEVA, A.; SHECHTER, Y. A cytosolic protein tyrosine kinase in rat adipocytes. *FEBS Letters*, v. 300, p. 93-96, 1991.

SHISHEVA, A.; SHECHTER, Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. *Biochemistry*, v. 31, p. 8052-8063, 1992.

SHISHEVA, A.; SHECHTER, Y. Role of cytosolic tyrosine kinase in mediating insulin-like actions of vanadate in rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 6463-6469, 1993a.

SHUKLA, R.; BARVE, V.; PADHYE, S.; BHONDE, R. Synthesis, structural properties and insulin-enhancing potential of bis(quercetinato)oxovanadium(IV) conjugate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Article in press, 2004.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. *Life Sciences*, v. 69, p. 977-986, 2001.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; WASSERMANN, G.F.; Rapid signal transduction in Sertoli cells. *European Journal of Endocrinology*, v. 147, p. 425-433, 2002.

SILVA, F.R.M.B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M.G.; WILLRICH, M.A.V.; DE SOUSA, E. Acute effect of Bauhinia forficata on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, p. 33-37, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª edição. Ed. Universidade/UFRGS/Ed UFSC, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES. Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus e Tratamento do Diabetes Mellitus Tipo II. São Paulo, 2002. 60 p.

SOEDER, R.W.; BASS, M.S. 1972 In: HIRAOKA, A.; HASEGAWA, M. Flavonoid glycosides from five Cyathea species. *Bot. Mag. Tokio*, v. 88, p. 127-130, 1975.

SOTO, C.P.; PEREZ, B.L.; FAVARI, L.P.; REYES, J.L. Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 119C, p. 125-129, 1998.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; BA, G.N.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 56, p. 200-207, 2002.



THOMPSON, K.H.; CHILES, J.; YUEN, V.G.; TSE, J.; McNEILL, J.H., ORVIG, C. Comparison of anti-hyperglycemic effect amongst vanadium, molybdenum and other metal maltol complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 98, p. 683-690, 2004.

THOMPSON, K.H.; LEICHTER, J.; McNEILL, J.H. Studies of vanadil sulfate as a glucose-lowering agent in STZ-diabetic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 197, (03), p. 1549-1555, 1993.

TSUJI, A.; SAKURAI, H. Vanadyl ion supresses nitric oxide production from peritoneal macrophages of streptozotocin-induced diabetic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 226, p. 506-511, 1996.

VAN HAEFTEN, T.W. Early disturbances in insulin secretion in the development of type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 197, p. 197-204, 2002.

VENKAT NARAYAN, K. M.; GREGG, E. W.; FAGOT-CAMPAGNA, A.; ENGELGAU, M. M.; VICINOR, F. Diabetes – a common, growing, serious, costly, and potentially preventable public health problem. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 50, Suppl. 2, p. S77 – S84, 2000.

VERSPOHL, E.J. Recommended testing in diabetes research. *Planta Medica*, v. 68, p. 581-590, 2002.

VESSAL, M.; HEMMATI, M.; VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology part C*, v. 135, p. 357-364, 2003.

VOLPATO, K.C.; MENEGAZ, D.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; GARCIA, E.V.; SILVA, F.M.B. Involvement of K<sup>+</sup> channels and calcium-dependent pathways in the action of T<sub>3</sub> on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of immature rat testis. *Life Sciences*, v. 74, p. 1277-1288, 2004.

WALLACE, J. Chemosystematic implications of flavonoids and C-glycosylxanthones in “Ferns”. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.17, (02), p. 145-153, 1989.

WATSON, R.T.; PESSIN, J.E. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Experimental Cell Research*, v. 271, p. 75-83, 2001.

WHO. Environmental Health Criteria Vol. 81. Vanadium. WHO, Geneva, 1988.

WHO. Expert Committee on Diabetes Mellitus, 1980. Second report. Technical report series 646. World Health Organization, Geneva.

WILLSKY, G.R.; GOLDFINE, A.B.; KOSTYNIK, P.J.; McNEILL, J.H.; YANG, L.Q.; KHAN, H.R.; CRANS, D.C. Effect of vanadium (IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro studies with vanadil sulfate and bis(maltolato)oxovanadium (IV). *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 85, p. 33-42, 2001

WOO, L.C.Y.; YUEN, V.G.; THOMPSON, K.H.; McNEILL, J.H.; ORVIG, C. Vanadyl-biguanide complexes as potential synergistic insulin mimics. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 76, p. 251-257, 1999.

YUEN, V.G.; CARAVAN, P.; GELMINI, L.; GLOVER, N.; McNEILL, J.H.; SETYAWATI, I.A.; ZHOU, Y.; ORVIG, C. Glucose-lowering properties of vanadium compounds: comparison of coordination complexes with maltol or kojic acid as ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, p. 110-116, 1997.

YUE-ZHONG, S. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

ZARZUELO, A.; JIMÉNEZ, I.; GÁMEZ, M.J.; UTRILLA, P.; FERNÁNDEZ, I.; TORRES, M.I.; OSUNA, I. Effects of luteolin 5-O- $\beta$ -rutinoside in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, v. 58, (25), p. 2311-2316, 1996.

ZIERATH, J.R.; KAWANO, Y. The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 17, (3), p. 385-398, 2003.